

Aus der 1. Medizinischen Klinik
Charité – Campus Buch
Medizinische Fakultät der Humboldt Universität Berlin
(Professor Friedrich C. Luft)

Genetische Einflußfaktoren auf den Lipidstoffwechsel

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Humangenetik

an der Charité
Medizinische Fakultät der
Humboldt Universität
Berlin

vorgelegt von
Dr. med. Hans Knoblauch
geb. am 27.04.1967 in Leverkusen

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Herr Professor Gerd Utermann
2. Frau Professor Ulrike Beisiegel

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 03.12.1002

ZUSAMMENFASSUNG

Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Folge arteriosklerotischer Prozesse sind die häufigste Todesursache weltweit. Lipidstoffwechselstörungen sind ein wichtiger Risikofaktor für die Pathogenese der Arteriosklerose. Komplexe Phänotypen, wie z.B. der Lipidstoffwechsel, werden durch eine Vielzahl von genetischen und Umweltfaktoren beeinflusst. Obwohl der Lipidstoffwechsel biochemisch gut charakterisiert ist und viele Gene, die für Proteine innerhalb des Lipidstoffwechsels kodieren bekannt sind, sind die spezifischen genetischen Faktoren, die die Variabilität des Lipidstoffwechsels beeinflussen, weitgehend unbekannt.

Die vorgelegten Studien zeigen verschiedene Ansätze, wie genetische Faktoren, die die Variabilität des Lipidstoffwechsels beeinflussen, identifiziert und quantifiziert werden können. Dabei wird ein besonderer Schwerpunkt auf die Untersuchung der Variabilität im nicht-pathologischen Bereich des Stoffwechsels gelegt.

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurden:

1. modifizierende Genorte bei familiären Hyperlipidämien identifiziert. Dieser Ansatz wurde am Beispiel von zwei Familien mit familiärer Hypercholesterinämie aus Israel und Syrien illustriert. Mit Hilfe der Familie aus Israel wurde ein Genort, der für einen Cholesterin-senkenden Effekt verantwortlich ist, kartiert. Mit Hilfe der Familie aus Syrien wurde ein Gen für die Ausprägung von Xanthomen postuliert.
2. der Einfluß von Genen und Genorten auf die Variabilität des Lipidstoffwechsels in einer Zwillingspopulation nachgewiesen. Dieser Ansatz wurde anhand von Genorten auf Chromosom 13q (Cholesterin-senkender Genort), auf Chromosom 8 (Lipoprotein Lipase und Makrophagen Scavenger Rezeptor) und dem PPAR γ -Gen auf Chromosom 3 illustriert.
3. der Einfluß einzelner genetischer Varianten in sechs Kandidatengenen des Lipidstoffwechsels in einer familienbasierten Stichprobe quantifiziert.
4. ein mathematisches Modell des Lipidstoffwechsels entwickelt, mit dem Ziel, sich der Komplexität des Stoffwechsels sowohl von experimenteller als auch von theoretischer Seite her zu nähern.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Lipidstoffwechsel als komplexer Phänotyp	1
1.2	Das Human Genome- und Diversity-Projekt	1
1.3	Von der monokausalen zur multikausalen Betrachtungsweise	2
1.4	Strategien zur Identifizierung genetischer Einflußfaktoren auf den Lipidstoffwechsel	3
1.5	Fragestellung	4
2	EIGENE ARBEITEN	5
2.1	Statistisch-genetische Methoden	5
2.1.1	Parametrische und nicht-parametrische Kopplungsanalysen mitquantitativen und qualitativen Merkmalen	5
2.2	Modifizierende Gene bei Patienten mit familiären Hyperlipidämien	7
2.2.1	Die familiäre Hypercholesterinämie	7
2.2.1.1	Ein Xanthomatose-Suszeptibilitäts-Gen in einer syrischen Familie mit Familiärer Hypercholesterinämie	7
2.2.1.2	Ein Cholesterin-senkender Genort auf Chromosom 13 in einer großen arabischen Familie mit familiärer Hypercholesterinämie (OMIM-Nummer *604595)	12
2.2.2	Die familiäre kombinierte Hyperlipidämie (FCHL)	22
2.2.2.1	Familien aus Deutschland und China mit familiärer kombinierter Hyperlipidämie (FCHL)	22
2.2.2.2	Kopplungsanalyse bei Familien mit familiärer kombinierter Hyperlipidämie	24
2.3	Zwillingsuntersuchungen innerhalb des Lipidstoffwechsels	25
2.3.1	Zwillingspopulation	25
2.3.2	Heritabilitätsberechnungen für Lipidphänotypen	27
2.3.3	QTL-Analysen mit Kandidatengenen des Lipidstoffwechsels	27
2.3.3.1	QTL-Analyse für die Region auf Chromosom 13, die ein Cholesterin-senkendes Gen enthält	28

2.3.3.2	QTL-Analyse für die Region auf Chromosom 8, die die Lipoprotein-Lipase und den Makrophagen Scavenger Rezeptor enthält	29
2.3.3.3	QTL-Analyse für eine Region auf Chromosom 3, die das PPAR γ -Gen enthält	30
2.4	Familienbasierte Assoziationsstudien an einer Bevölkerungsstichprobe	33
2.4.1	Varianzkomponenten-Analyse	33
2.4.2	Studienpopulation für eine familienbasierte Assoziationsstudie	34
2.4.3	SNPs, Haplotypen und Linkage Disequilibrium	37
2.5	Theoretische Modellierung des Lipidstoffwechsels	48
3	DISKUSSION	55
4	LITERATURVERZEICHNIS	63
5	DANKSAGUNG	73

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ApoE	Apolipoprotein E
CETP	Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein
DZ	Dizygoter Zwilling
FCHL	Familiäre kombinierte Hyperlipidämie
FH	Familiäre Hypercholesterinämie
HDL-C	High-Density-Lipoprotein-Cholesterin
HL	Hepatische Triglyzerid Lipase
IBD	Identical-by-descent
LCAT	Lecithin: Cholesterol-Acyltransferase
LDLR	LDL-Rezeptor
LDL-C	Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin
LPL	Lipoprotein Lipase
LRP	LDL-Rezeptor-related Protein
LR	Likelihood-Ratio
MZ	Monozygoter Zwilling
p	Irrtumswahrscheinlichkeit/Signifikanzniveau
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
QTL	Quantitativer Trait Locus
SD	Standardabweichung
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
TC	Gesamtcholesterin
TGL	Triglyzeride

1 Einleitung

1.1 Lipidstoffwechsel als komplexer Phänotyp

Mehr als die Hälfte aller Todesfälle in Industrienationen werden auf die Folgen arteriosklerotischer Gefäßveränderungen zurückgeführt (Murray und Lopez, 1997). Die Pathogenese der Arteriosklerose basiert auf einem komplexen Zusammenspiel von Umweltfaktoren und genetischen Faktoren (Ross, 1999). Insbesondere bei der Manifestation der Arteriosklerose bei jüngeren Menschen spielen genetische Faktoren eine große Rolle (Goldstein et al. 1973; Marenberg et al. 1994). Serumlipide spielen als Risikofaktor für die Arteriosklerose eine entscheidende Rolle. Serum Gesamtcholesterin, Low-Density-Lipoprotein Cholesterin (LDL-C), und Triglyzeride (TGL) sind direkt mit dem Herz-Kreislauf-Risiko korreliert, während Serum High-Density-Lipoprotein Cholesterin (HDL-C) invers korreliert ist (Kannel et al. 1971; Assmann et al. 1992). Das LDL-C nimmt bei der Entstehung der Arteriosklerose eine zentrale Rolle ein (Brown und Goldstein, 1986). Die Variabilität der Serumlipide unterliegt zu einem großen Teil genetischen Faktoren, was insbesondere mit Hilfe von Zwillingsuntersuchungen gezeigt werden konnte (Marenberg et al., 1994; Knoblauch et al. 1997). Obwohl monogene Formen der Hyperlipidämie viel zum Verständnis der Pathophysiologie des Lipidstoffwechsels beigetragen haben (Luft, 1995), der Lipidstoffwechsel biochemisch gut charakterisiert ist (Beisiegel, 1998) und viele Gene der beteiligten Rezeptoren (z.B. der LDL-Rezeptor), Transportproteine (z.B. das Cholesterinester Transfer Protein) und Enzyme (z.B. die Lipoprotein Lipase, die Hepatische Triglyzerid Lipase) bekannt sind (Scriver, 1995), sind die genetischen Einflußfaktoren, die die Variabilität von Serumlipiden innerhalb des physiologischen Bereichs beeinflussen, zum größten Teil unbekannt. Die Identifikation genetischer Faktoren, die im physiologischen Bereich die Variabilität des Phänotyps beeinflussen, ist jedoch für das weitere Verständnis des Lipidstoffwechsels und pathologischer Zustände (polygen bedingte Hyperlipidämien) von großer Bedeutung.

1.2 Das Human Genome- und Diversity-Projekt

Das Humane Genomprojekt trat mit der Veröffentlichung der ersten nahezu kompletten Sequenz des menschlichen Erbguts in eine neue Phase ein (Venter et al., 2001, Mc Pherson et al., 2001). Der Schwerpunkt der Genomforschung richtet sich jetzt nicht mehr primär

auf die Identifizierung neuer Gene, sondern vielmehr auf das Verständnis des Beitrags einzelner Gene zu bestimmten Phänotypen. Zusätzlich zu der Veröffentlichung der Sequenz des menschlichen Genoms werden durch das *Human Genome Diversity* Projekt genetische Varianten, die zwischen Individuen bestehen, identifiziert (The International SNP Map Working Group., 2001; <http://snp.cshl.org/>). Der größte Teil dieser Varianten sind Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), die an ca. jeder tausendsten Base des menschlichen Genoms vorkommen (Sachidanandam et al., 2001). Ziel des *Human Genome Diversity* Projekts ist es, eine Beziehung zwischen der Variabilität der DNA-Sequenz und der Variabilität eines Phänotyps darzustellen. Ein Schwerpunkt des *Human Genome Diversity* Projekts liegt auf der Analyse komplexer Erkrankungen, wie z.B. Fettstoffwechselstörungen, Arteriosklerose, Diabetes mellitus Typ II, Adipositas, etc. Diesem Schwerpunkt liegt die Hypothese zugrunde, daß die genetischen Anteile dieser häufigen, komplexen Erkrankungen nur durch häufige genetische Varianten beeinflusst werden können. Diese Hypothese wird unter dem Namen *common variant – common disease*-Hypothese zusammengefasst (Collins et al., 1997).

1.3 Von der monokausalen zur multikausalen Betrachtungsweise

Die Erwartungen an das humane Genomprojekt, zum Verständnis der Pathogenese komplexer Krankheiten beizutragen und neue Ansatzpunkte für die Therapie zu liefern, sind bis heute nur in Einzelfällen erfolgreich (Van Ommen, 2002), aber insgesamt unbefriedigend eingelöst worden. Einige der möglichen Erklärungen für diese unbefriedigenden Ergebnisse werden im folgenden diskutiert. Der Begriff des komplexen Phänotyps suggeriert bereits, daß eine Vielzahl von Umwelt- und genetischen Faktoren für die Ausprägung eines Merkmals verantwortlich ist. Diese Komplexität betrifft nicht nur Phänotypen wie die Arteriosklerose oder den Fettstoffwechsel, sondern kann auch bei monogen bedingte Erkrankungen, wie z.B. der Familiären Hypercholesterinämie (Hegele, 2002) eine wichtige Rolle spielen. In der Vergangenheit wurden jedoch häufig einzelne Faktoren, z.B. die Assoziation *eines* Polymorphismus mit *einem* Phänotyp untersucht. Mit dieser Betrachtungsweise sind folgende Probleme verbunden:

1. Das Vorgehen suggeriert eine monokausale Interpretation der Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp. Diese monokausale Betrachtungsweise wird den vielfältigen Zusammenhängen von Stoffwechselsystemen häufig nicht gerecht (Cornish-Bowden, 1999).

2. Die untersuchten Polymorphismen sind evolutionär häufig neutral und nicht funktionell wirksam, sondern befinden sich im „Linkage Disequilibrium“ mit einem funktionell wirksamen Polymorphismus (Pritchard und Przeworski, 2001).
3. Bei der Interpretation von Assoziationsstudien muß der genetische Hintergrund, d.h. die Summe anderer genetisch bedingter Einflußgrößen, mit in Betracht gezogen werden (Higgins, 2000).
4. Weiterhin handelt es sich bei Phänotypen wie z.B. der koronaren Herzerkrankung um klinisch definierte qualitative Endpunkte, die durch eine Reihe von Risikofaktoren beeinflusst werden. Diese Risikofaktoren sind in der Regel quantitative Größen, wie z.B. die Höhe der LDL-Cholesterinkonzentration. Überwiegend wurden bisher Assoziationenstudien zwischen Polymorphismen und qualitativen klinischen Endpunkten durchgeführt, ohne zu berücksichtigen, daß diese qualitativen Merkmale durch quantitative Phänotypen beeinflusst werden. Durch diese Betrachtungsweise kann jedoch ein großer Teil wichtiger Informationen verloren gehen.

1.4 Strategien zur Identifizierung genetischer Einflußfaktoren auf den Lipidstoffwechsel

Um den beschriebenen Problemen gerecht zu werden und genetische Einflußgrößen in komplexen Stoffwechselsystemen wie z.B. dem Lipidstoffwechsel zu identifizieren, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, von denen im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Strategien beschrieben werden:

1. die Identifikation modifizierender Genorte, die für die Variabilität von Phänotypen in Familien mit monogenen Hyperlipidämien verantwortlich sind (Nadeau, 2001).
2. Zwillingsstudien zur Heritabilitätsberechnung und zur Beurteilung, ob ein Genort mit einem Phänotyp gekoppelt bzw. assoziiert ist (Martin et al., 1997).
3. Familienbasierte Assoziationsstudien mit Hilfe von Varianzkomponenten-Analysen (Sham et al., 2000)
4. Die mathematische Modellierung eines Stoffwechselsystems (Cornish-Bowden, 1999).

1.5 Fragestellung

Welche genetischen Faktoren beeinflussen den Lipidstoffwechsel und mit welchen Methoden können genetische Einflußfaktoren komplexer Phänotypen am Beispiel des Lipidstoffwechsels untersucht werden?

2 EIGENE ARBEITEN

2.1 Statistisch-genetische Methoden

Die nachfolgenden Arbeiten beruhen auf den Prinzipien der Kopplungsanalysen. Bevor die entsprechenden Arbeiten vorgestellt werden, wird daher das Prinzip von Kopplungsanalysen kurz erläutert.

2.1.1 Parametrische und nicht-parametrische Kopplungsanalysen mit quantitativen und qualitativen Merkmalen

In Kopplungsanalysen wird getestet, ob innerhalb einer Familie ein Markerallel, z.B. gemessen als Länge eines Mikrosatellitenmarkers, überzufällig häufig zusammen mit einem bestimmten Phänotyp vererbt wird (segregiert). Bei Kopplungsanalysen kann zwischen modellbasierten Verfahren (z.B. die klassische LOD-score Methode), die ein bestimmtes Vererbungsmodell zugrundelegen, und modellfreien Verfahren, die kein Vererbungsmodell berücksichtigen, unterschieden werden.

Bei den modellbasierten Verfahren wird ein genetisches Modell vorausgesetzt, aus dem unter der Vorgabe einer Rekombinationsrate θ die "likelihood" die Daten in dieser Form zu beobachten ausgerechnet wird. Zum Vergleich wird die „likelihood“ der Daten unter der Annahme freier Rekombination ($\theta = 0.5$) berechnet und der Zehner-Logarithmus des Quotienten gebildet. Ist dieser sogenannte LOD-score > 3 , dann ist die „likelihood“ der Daten unter diesem Rekombinationsmodell 1000x größer als unter dem rekombinationsfreien Modell mit $\theta = 0.5$ (Ott et al., 1991).

$$Z(\theta) = \log_{10}[L(\theta)/L(\theta=0.5)]$$

Wenn über den Vererbungsmodus eines Phänotyps nicht entschieden werden kann, können modellfreie Verfahren eingesetzt werden. modellfreie Verfahren sind insbesondere bei komplexen Erkrankungen von Bedeutung, bei denen der Vererbungsmodus in der Regel nicht einem Mendel'schen Erbgang folgt. Beispielhaft wird im folgenden die *Affected-Sib-Pair Analysis* dargestellt, da sie bei der Kartierung des Cholesterin-senkenden Genortes auf Chromosom 13 eine entscheidende Rolle spielt. Bei der *Affected-Sib-Pair Analysis* geht man von folgender Annahme aus: Ist ein Locus mit einem für die Krankheit verantwortlichen Gen eng gekoppelt, wird zusammen mit dem ursächlich beteiligten Gen auch ein bestimmtes benachbartes Allel (z.B. der untersuchte Mikrosatellitenmarker) an

die Nachkommen weitergegeben. Man untersucht also, wie oft zwei Geschwister dasselbe Markerallel von den Eltern erhalten haben. Ein solches Allel wird „*identical-by-descent*“ oder IBD genannt. Zwei betroffene Geschwister können 0, 1 oder 2 Allele gemeinsam haben. Liegt keine Kopplung vor, erwartet man diese Ereignisse (IBD 0, 1 und 2) im Verhältnis 1 : 2 : 1. Betrachtet man einen qualitativen Phänotyp, z.B. den Krankheitsstatus erwartet man bei Kopplung eine größere Anzahl von gemeinsamen Allelen IBD, bzw. eine Abweichung von dem Verhältnis 1 : 2 : 1 (Krugylak et al., 1996).

Betrachtet man quantitative Merkmale, wie z.B. das LDL-Cholesterin beruht die Analyse auf der Annahme, daß Geschwisterpaare mit größerer genetischer Übereinstimmung (IBD) auch für die entsprechenden Phänotypen eine Ähnlichkeit zeigen sollten. Für diese Analyse wird z.B. die Methode von Haseman und Elston eingesetzt, die auf einer Regression zwischen dem IBD-Status und der quadrierten Paardifferenz der Meßwerte beruht. Eine signifikante Regression ist der Nachweis einer Kopplung zwischen Genort und einem für den Meßwert funktionell relevanten Gen (Krugylak et al., 1995).

2.2 Modifizierende Gene bei Patienten mit familiären Hyperlipidämien

2.2.1 Die familiäre Hypercholesterinämie

Die familiäre Hypercholesterinämie (FH) ist eine autosomal dominante Erkrankung (Khachadurian, 1964), die durch Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen (Chromosom 19) (Hobbs et al., 1992), im Apolipoprotein-B-Gen (Chromosom 2) oder zur Zeit noch unbekannten Genen bedingt ist. Mutationen im ARH-Gen (Chromosom 1) führen zu einer autosomal-rezessiven Form der FH (Garcia et al., 2001). Die FH führt im heterozygoten Zustand zu einer zwei- bis dreifachen Erhöhung des LDL-Cholesterins und im homozygoten Zustand zu einer ca. sechsfachen Erhöhung des LDL-Cholesterins. 50% der heterozygoten Individuen sterben an den Folgen eines Herzinfarktes vor dem 60. Lebensjahr (Umans-Eckenhausen et al., 2001). Die klinische Variabilität der FH ist groß, so daß modifizierende Gene angenommen wurden, die für diese Variabilität verantwortlich sind.

2.2.1.1 Ein Xanthomatose-Suszeptibilitäts-Gen in einer syrischen Familie mit Familiärer Hypercholesterinämie

In Zusammenarbeit mit der Universität von Damaskus in Syrien wurde eine große Familie mit familiärer Hypercholesterinämie untersucht. Von insgesamt 203 Familienmitgliedern konnten 49 Personen in die Untersuchung einbezogen werden. Alle Familienmitglieder mit einer familiären Hypercholesterinämie konnten auf zwei Paare gemeinsamer Vorfahren zurückgeführt werden. Die gemeinsamen Vorfahren trugen den gleichen Namen, so daß es möglich ist, daß auch diese Personen wiederum einen gemeinsamen Vorfahren hatten. Ein Teil des Stammbaums ist in Abbildung 2 dargestellt. Von den in die Untersuchung einbezogenen Personen wurden auf der Basis von Cholesterin-Werten und der molekulargenetischen Untersuchung des LDLR-Gens 7 Personen als homozygote und 33 als heterozygote FH-Patienten klassifiziert. Die Lipidwerte der 49 Personen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Lipidwerte von homozygoten, heterozygoten und nicht-betroffenen Personen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0.05$). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung.

Cholesterin: $\text{mmol/L} = 0.01129 \times \text{mg/dl}$, Triglyzeride: $\text{mmol/L} = 0.0286 \times \text{mg/dl}$

	Homozygot	Heterozygot	nicht-betroffen
	MW \pm SD	MW \pm SD	MW \pm SD
TC (mmol/l)*	17.7 \pm 2.5	7.8 \pm 1.2	4.5 \pm 0.9
LDLC (mmol/l)*	16.5 \pm 2.3	6.2 \pm 1.0	2.6 \pm 0.6
HDLC (mmol/l)	0.6 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	1.3 \pm 0.4
TGL (mmol/l)	1.3 \pm 0.7	2.3 \pm 1.7	1.4 \pm 1.1
Lp(a) (mg/dl)	61.6 \pm 37.8	35.9 \pm 33.6	18.7 \pm 10.5

Auf der Basis der klinischen Untersuchung konnten die betroffenen FH-Patienten in zwei Gruppen eingeteilt werden: eine Gruppe mit kleinen Xanthomen und eine Gruppe mit extrem großen Xanthomen. Die Hälfte aller homozygoten Personen hatte extrem große Xanthome, während die andere Hälfte und die Hälfte der heterozygoten Personen mit FH kleine Xanthome hatte. Die andere Hälfte der heterozygoten Personen hatte keine Xanthome. In Tabelle 2 sind die Lipidwerte der homozygoten Personen mit kleinen und extrem großen Xanthomen gegenübergestellt, um zu zeigen, daß sich die beiden Gruppen hinsichtlich dieser Parameter (mit Ausnahme des Lp(a)) nicht unterscheiden.

Tab. 2: Lipidwerte der homozygoten Patienten mit kleinen und extrem großen Xanthomen.

	extrem große Xanthome			kleine Xanthome		
ID Nummer (s. Abb. 2)	116	118	112	1	4	75
Geschlecht (männlich/weiblich)	m	m	w	w	m	w
Alter (Jahre)	15	12	27	17	15	14
BMI (kg/m^2)	19,7	18,1	21,5	17,6	25,5	16,8
TC (mmol/l)	15,6	18,1	14,2	16,9	17,6	19,2
LDLC (mmol/l)	14,7	17,1	13,2	16,0	16,4	17,5
HDLC (mmol/l)	0,5	0,5	0,6	0,7	0,8	0,6
TGL (mmol/l)	0,9	1,2	0,9	0,6	0,9	2,5
Lp(a) (mg/dl)	11	27	68	83	43	123

Alle betroffenen FH-Patienten dieser Familie haben eine T nach C Mutation in Exon 14 (Codon 646, Nukleotid 1999), die zu einem Cystein nach Arginin-Austausch (C646R) führt.

Ein Beispiel für die phänotypische Variabilität monogener Hyperlipidämien ist die Größe der Xanthome bei Patienten mit FH (Beaumont et al., 1976). Xanthome sind lokalisierte Infiltrate, insbesondere im Bereich der Haut und der Strecksehnen, bestehend aus Lipid-beladenen Makrophagen (Grewal et al., 1998). Abbildung 1 zeigt zwei Mitglieder einer großen konsanguinen syrischen Familie mit FH und einer stark unterschiedlich ausgeprägten Xanthomatose. Beide Patienten tragen die gleiche Mutation homozygot im Exon 14 des LDL-Rezeptorgens, die zu einem Verlust eines Cysteins in der EGF-precursor-Domäne des Rezeptor-Proteins führt (Vergopoulos et al., 1997).



Abb. 1: In der oberen Reihe sind die Xanthome eines homozygoten Patienten mit FH an den Knien, den Ellenbogen und den Fingern dargestellt. In der unteren Reihe sind die extrem großen Xanthome eines anderen homozygoten Patienten mit FH aus der gleichen Familie mit der gleichen Mutation dargestellt

Dieses Phänomen der unterschiedlich ausgeprägten Xanthomatose wurde noch bei mehreren Familienmitgliedern beobachtet.

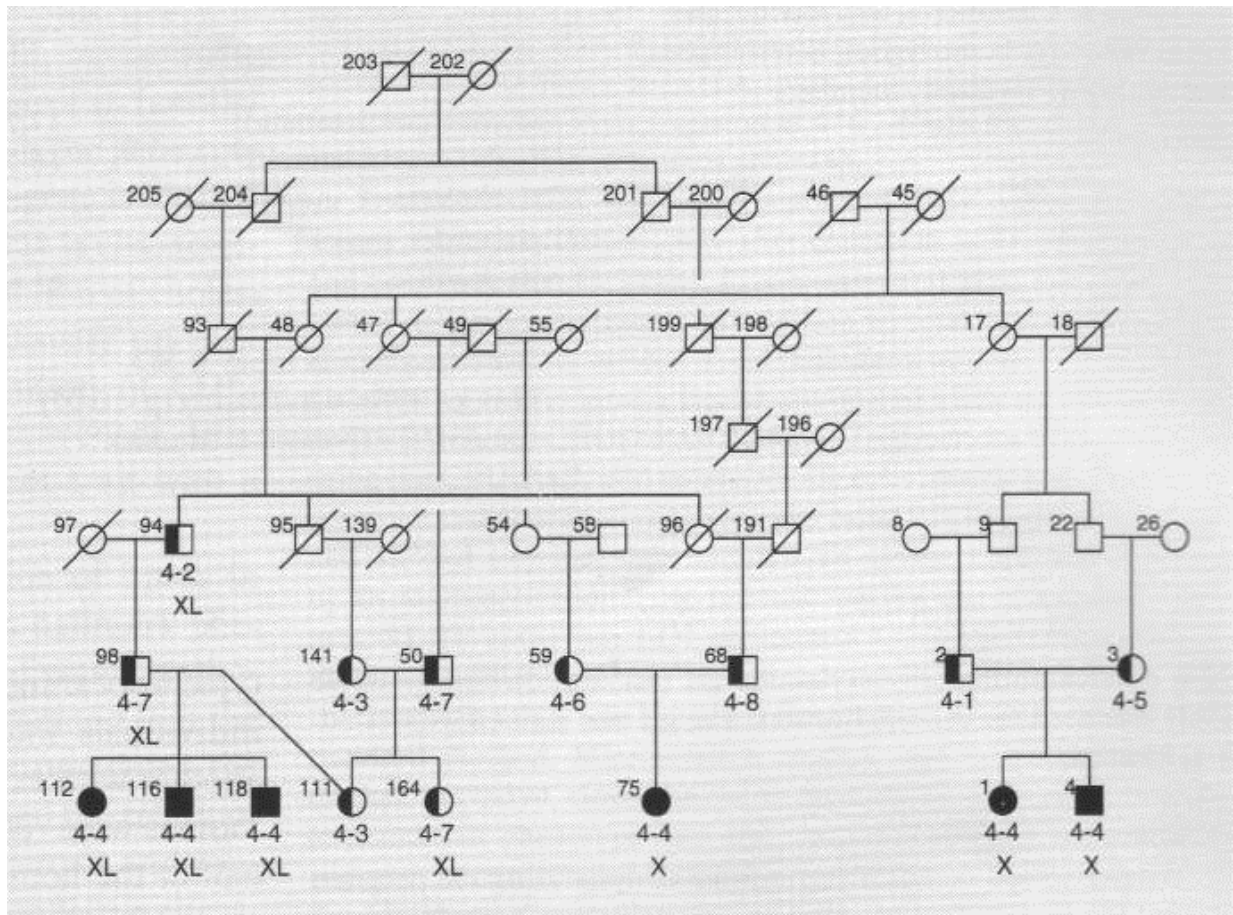


Abb. 2: Ausschnitt aus dem Stammbaum der syrischen Familie mit FH. Der Stammbaum zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse, den Status am LDL-Rezeptor-Gen (halb ausgefülltes Symbol = heterozygote Mutation im LDLR-Gen ; ganz ausgefülltes Symbol = homozygote Mutation im LDLR-Gen) und ob die betroffenen Personen große (XL) oder kleine Xanthome haben (X).

Ein Vergleich der Lipidwerte und des BMI der betroffenen Familienmitglieder ergab keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Lipidkonzentrationen, die für den unterschiedlichen Grad der Xanthomatose verantwortlich sein könnte. Aus diesem Grund wurde ein zweites modifizierendes Gen, das für die unterschiedliche Ausprägung der Xanthomatose verantwortlich ist, angenommen. Mit Hilfe einer Segregationsanalyse konnte gezeigt werden, daß ein zweites vom LDL-Rezeptor-Gen unabhängiges Gen die unterschiedliche Ausprägung der Xanthomatose erklären kann. Die Segregation des Merkmals „extrem große Xanthome“ folgte dabei einem autosomalen Erbgang, wobei mit Hilfe der Segregationsanalyse kein signifikanter Unterschied zwischen einem rezessiven und einem dominanten Erbgang gezeigt werden konnte. Die Identifizierung eines Xanthomatose-Suszeptibilitäts-Gens könnte für das Verständnis der Ablagerung von Cholesterin im Gewebe und in arteriosklerotischen Plaques der Gefäßwände von Bedeutung sein.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der folgenden Originalarbeit veröffentlicht:

*Vergopoulos A, Bajari T, Jouma M, **Knoblauch H**, Aydin A, Bahring S, Mueller-Myhsok B, Dresel A, Joubran R, Luft FC, Schuster H. A xanthomatosis-susceptibility gene may exist in a Syrian family with familial hypercholesterolemia. Eur J Hum Genet. 1997; 5:315-23.*

2.2.1.2 Ein Cholesterin-senkender Genort auf Chromosom 13 in einer großen arabischen Familie mit familiärer Hypercholesterinämie (OMIM-Nummer *604595)

Die LDLC-Konzentrationen bei Patienten mit FH können sehr variabel sein. Die Beobachtung von variablen LDLC-Konzentrationen bei Personen mit FH aus einer Familie, die die gleiche Mutation im LDL-Rezeptor-Gen tragen, führte zu der Hypothese, daß es Gene gibt, die die Höhe des LDLCs modifizieren. Erstmals wurde von Hobbs et al. (1989) eine Familie beschrieben, in der Patienten mit FH trotz nachgewiesener Mutation im LDL-Rezeptor-Gen LDLC-Werte im Normbereich haben. Dies führte zu der Hypothese, daß ein Cholesterin-senkendes Gen in dieser Familie segregiert, das in der Lage ist, für die Mutation im LDLR-Gen zu kompensieren. Zusammen mit Professor Eran Leitersdorf von der Hadassah Universität in Jerusalem wurde eine große arabische Familie mit FH untersucht, bei der ein ähnliches Phänomen beobachtet werden konnte (Knoblauch et al., 2000). Innerhalb dieser Familie konnte eine Mutation im Exon 17 des LDLR-Gens nachgewiesen werden. Die Mutation führt zu einer Cystein-zu-Tyrosin-Substitution im cytoplasmatischen Teil des LDLR-Gens. Die Mutation ist als J.D.Bari-Mutation bekannt und führt zu einer Reduktion der Rezeptorfunktion auf 5% durch eine defekte Internalisierung des Rezeptors in Clathrin-Vesikeln (Davis et al., 1986).

Insgesamt wurden 96 Familienmitglieder untersucht, nachdem eine schriftliche Einverständniserklärung von allen Probanden erteilt wurde. Blut wurde für die Bestimmung der Lipidwerte und die Extraktion der DNA aus Lymphozyten entnommen. Das LDL-Cholesterin wurde anhand der Friedewald-Formel berechnet (Friedewald et al. 1972). Um verlässliche Lipidwerte zu haben, wurden die Lipidbestimmungen wiederholt durchgeführt. Alle Familienmitglieder leben gemeinsam in einem Dorf und haben vergleichbare Ernährungsgewohnheiten, die typisch für diese Region sind (fett- und ballaststoffreich). Durch die Sequenzierung aller Exone (siehe Genotypisierung) des LDLR-Gens auf Chromosom 19 wurde die verantwortliche Mutation in Exon 17 des LDLR-Gens nachgewiesen. Anschließend wurden alle Familienmitglieder auf die An- bzw. Abwesenheit der Mutation untersucht. In Tabelle 3 sind das Alter, das Geschlecht, der Mutationsstatus am LDLR-Gen sowie die Lipidwerte, die für das Alter und das Geschlecht korrigiert wurden, dargestellt.

Tab. 3: Lipidwerte von 96 Familienmitgliedern der arabischen Familie. Die arabische ID-Nummer entspricht der Nummer im Stammbaum in Abbildung 3, die römische ID-Nummer entspricht der Nummer im Stammbaum in Abbildung 3. M = männlich; W = weiblich; LDLR beschreibt den Mutationsstatus am LDLR-Gen, 1 = heterozygot, 2 = homozygot; das „LDL-C adjusted“ entspricht den alters- und geschlechtskorrigierten LDL-C-Werten. LDL-C adjusted wurde nur bei den LDLR-heterozygoten Personen berechnet.

ID	Alter	M/W	LDLR	TC	LDL-C	HDL-C	TGL	LDL-C adjusted
1 V:7	32	M	1	260	211	39	51	197
2 V:8	32	W	1	231	187	31	64	178
3	11	W	2	653	717	23	64	
4	05	M	2	837	736	47	221	
5	07	W	1	232	175	41	78	203
6 VI:4	03	M	1	182	115	36	157	80
7	23	M	2	552	501	41	48	
8	22	M	2	606	567	25	72	
9	27	M	2	520	461	38	191	
10	26	W	2	618	566	29	115	
11 IV:1	62	W	1	435	341	30	319	238
12 IV:2	63	M	1	158	111	36	55	126
13	31	W	1	237	184	41	62	176
14	17	W	1	218	164	36	92	169
15 V:5		W	1	264	207	47	50	
16 VI:3	05	M	1	177	126	40	54	110
17	04	M	1	242	172	56	68	208
18	26	W	0	185	113	51	104	
19 VI:2	07	M	1	182	111	82	55	85
20	04	W	1	209	144	39	131	147
21	03	M	1	221	165	33	116	196
22	02	W	1	229	152	32	225	167
23	29	W	0	276	193	52	157	
24	12	M	0	147	62	78	33	
25	25	M	0	122	77	36	46	
26	13	M	2	567	513	37	87	
27	08	W	2	440	392	18	149	
28 VI:1	03	W	1	190	142	29	93	143
29 IV:7	55	W	1	295	223	32	160	185
30 IV:6	55	M	1	260	190	45	127	167
31 IV:5	54	M	1	188	135		79	137
32	19	W	0	142	85	41	81	
33	31	M	0	174	108	51	74	
34	51	W	0	191	129	48	71	
35 IV:4	57	W	1	130	71	22	187	104
36	16	W	0	119	52	45	112	
37	21	W	1	178	130	41	37	129
38	23	W	0	144	85	47	59	
39	29	M	1	244	185	46	54	179
40	20	W	0	127	68	41	88	
41	24	M	1	214	158	44	58	157
42	32	M	0	171	100	47	118	
43	03	M	1	231	182	35	70	235
44 V:6	24	W	1	199	136	51	59	136
45	23	M	0	175	86	57	159	
46	46	M	0	226	146	30	252	
47 V:1	42	W	1	223	140	26	286	140
48	07	M	1	210	141	56	63	140
49	02	M	2	463	424	24	77	

50	30	W	1	345	253	55	184	236
51	20	M	0	157	98	47	61	
52	11	M	0	130	82	40	38	
53	50	M	0	199	130	28	205	
54 V:3	35	W	1	222	165	40	86	159
55	19	M	0	102	53	43	32	
56	05	M	0	152	96	50	32	
57	03	M	1	202	149	41	60	159
58	02	M	1	181	132	44	26	118
59	14	M	0	176	119	36	106	
60	24	M	1	184	132	43	43	132
61 IV:9	65	M	0	212	159	26	134	
62	30	W	1	251	202	36	67	192
63	33	M	0	171	110	44	83	
64	27	W	1	237	183	35	94	179
65	29	M	0	181	127	40	72	
66 IV:8	60	W	1	285	221	33	156	181
67	38	M	0	163	108	42	65	
68	38	W	0	226	157	42	137	
69	36	W	0	180	96	40	218	
70	03	M	0	178	116	47	77	
71	04	W	0	147	91	42	70	
72	21	W	0	158	107	41	52	
73	45	M	0	276	172	29	375	
74	40	W	1	328	258	33	185	221
75	46	M	0	239	155	65	94	
76	12	M	1	255	179	57	97	196
77	13	W	1	190	122	59	47	114
78	21	M	0	130	82	38	52	
79	10	M	1	225	179	33	67	201
80	20	M	0	123	80	40	14	
81	08	W	0	156	89	36	156	
82	18	W	1	266	176	31	295	182
83	04	M	0	261	105	37	194	
84	14	W	1	216	160	33	117	166
85	13	W	0	173	103	31	194	
86	18	M	0	111	56	46	47	
87	13	M	0	118	49	36	164	
88	09	W	0	181	127	41	63	
89	34	M	0	201	115	29	287	
90	12	M	0	197	133	39	127	
91	06	M	0	147	68	32	233	
92	04	W	0	186	125	44	86	
93	04	W	0	161	101	36	12	
94	24	M	0	149	89	32	142	
95	20	W	1	311	252	32	134	264
96	01	M	1	228	171	28	145	220

In Abbildung 3 ist der Stammbaum der arabischen Familie dargestellt. Insbesondere fallen die vielen Konsanguinitätsschleifen, die durch Doppellinien gekennzeichnet sind, auf.

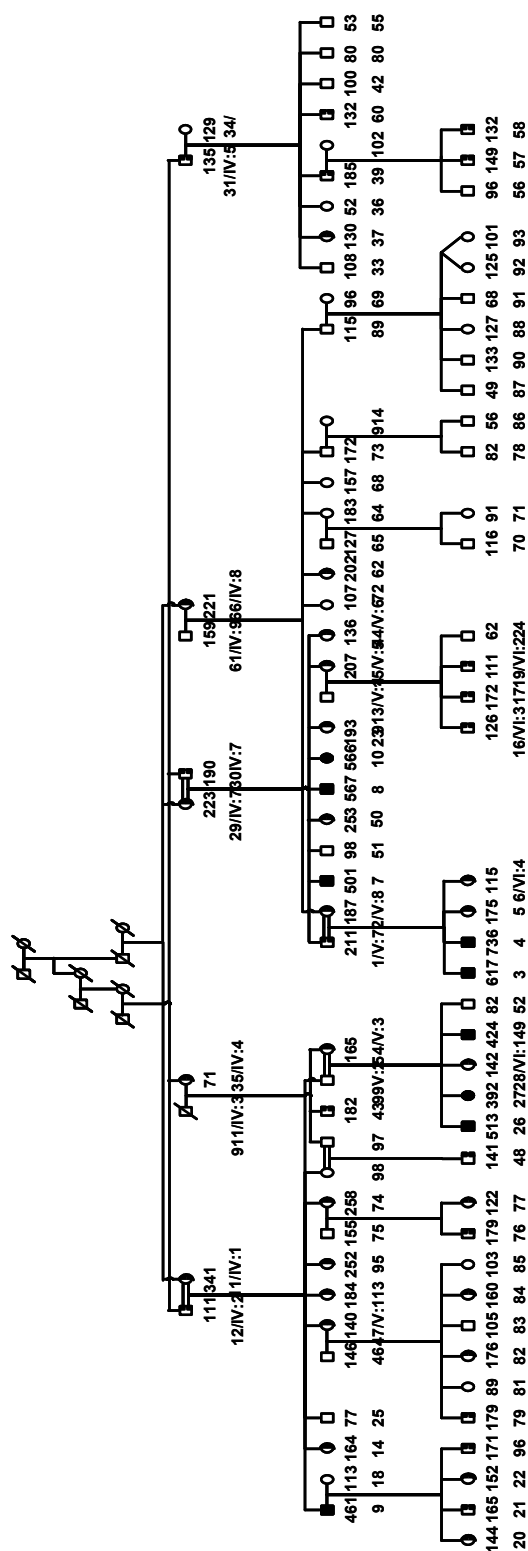


Abb. 3: Stammbaum der arabischen Familie. Halb ausgefüllte Kästchen bedeuten, daß eine heterozygote LDL-Rezeptor-Gen-Mutation vorliegt, ganz ausgefüllte Kästchen bedeuten, daß eine homozygote LDLR-Gen-Mutation vorliegt. Ein Sternchen (*) markiert Personen, die einen Cholesterin-senkenden Phänotyp aufweisen. Die obere Zahl unterhalb des Stammbaumsymbols gibt die LDLC-Konzentration an, die untere Zahl ist die ID-Nummer, die in Tabelle 3 wiedergefunden werden kann.

Tabelle 4 zeigt die LDLC-Werte, die LDLC-Werte korrigiert für Alter und Geschlecht sowie ApoB und ApoE Genotypen der Familienmitglieder dieses Teilstammbaums der Familie, in dem der Cholesterin-senkende Phänotyp besonders deutlich wird:

Tab. 4: Demographische Daten von ausgewählten Familienmitgliedern mit heterozygotem (FH = 1) und ohne (FH = 0) LDL-Rezeptor-Defekt. Personen mit dem Cholesterin-senkenden Phänotyp sind mit einem * markiert. Um auszuschließen, dass der Cholesterin-senkende Effekt durch Mutationen im ApoB- oder ApoE-Gen verursacht wurde, wurden ein VNTR (ApoB) und der ApoE $\epsilon 2/3/4$ Polymorphismus bestimmt und eine Assoziation ausgeschlossen.

ID	Alter	Geschlecht	LDL	LDL alterskorrigiert	FH	Genotypen	
						ApoB	ApoE
IV:1	62	F	341	238	1	1,2	3,3
IV:2	63	M	111*	126*	1	1,3	3,3
IV:4	57	F	71*	104*	1	3,3	3,3
IV:5	54	M	135*	137*	1	1,3	3,4
IV:6	55	M	190	167	1	1,3	3,4
IV:7	55	F	223	185	1	1,4	3,3
IV:8	60	F	221	181	1	1,2	3,3
IV:9	65	M	159		0	3,3	3,3
V:1	42	F	140*	140*	1	2,3	3,3
V:3	35	F	165	159	1	2,3	ND
V:5	?	F	207		1	1,1	3,4
V:6	24	F	136*	136*	1	1,1	3,3
V:7	32	M	211	197	1	1,1	3,4
V:8	32	F	187	178	1	2,3	3,3
VI:1	3	F	142*	143*	1	2,2	3,3
VI:2	7	M	111*	85*	1	1,3	3,3
VI:3	5	M	126*	110*	1	1,3	3,3
VI:4	3	M	115*	80*	1	1,2	3,4

Nachdem die LDLC-Werte für Alter und Geschlecht korrigiert wurden, konnte eine signifikante zweigipflige Verteilung mit einem Cut-off-LDLC-Wert bei 147 mg/dl bei heterozygoten FH-Patienten gezeigt werden. Der Cut-off-Wert diente als Grundlage für die Einteilung in Familienmitglieder *mit* dem Cholesterin-senkenden-Phänotyp und *ohne* den Cholesterin-senkenden-Phänotyp.

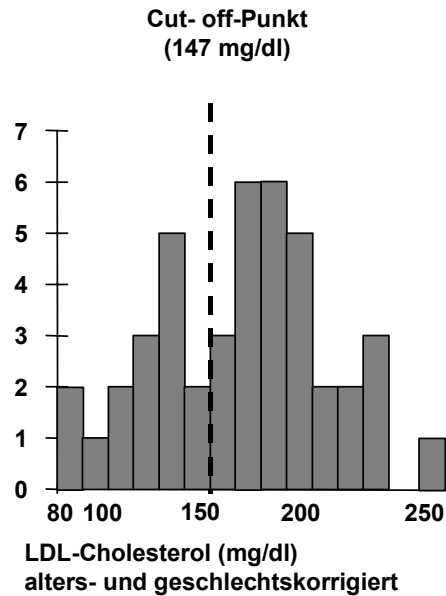


Abb. 4: Zweigipflige Verteilung der alters- und geschlechtskorrigierten LDLC-Werte bei heterozygoten FH-Patienten.

Auf der Basis dieser Klassifikation, die im Detail in der Originalarbeit beschrieben wird, wurde eine Genom-weite Kopplungsanalyse mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern bei Personen aus dem Kernstammbaum aus Abbildung 5 durchgeführt mit dem Ziel ein Cholesterin-senkendes Gen zu kartieren.

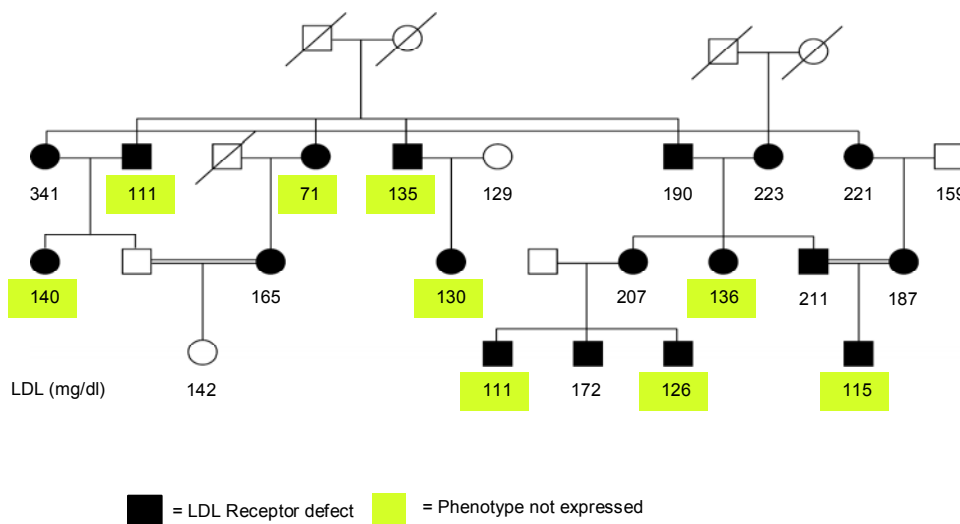


Abb. 5: Kernstammbaum, der für die Genom-weite Kopplungsanalyse eingesetzt wurde. Der Stammbaum zeigt einen Ausschnitt des Stammbaums der Familie. Schwarz ausgefüllte Symbole kennzeichnen Familienmitglieder, die die Träger der heterozygoten Mutation im LDLR-Gen sind. Unter den Symbolen sind die LDLC-Konzentrationen dargestellt. Einige Personen haben LDLC-Werte, die im Normbereich liegen oder deutlich unter den Werten, die bei heterozygoter FH erwartet werden. Diese LDLC-Werte sind gelb unterlegt.

Zunächst wurden acht chromosomale Regionen identifiziert, die weiter untersucht wurden (zwei auf Chromosom 1 und 12 und eine auf Chromosom 6, 13, 16 und 18). Die LOD-scores der Region auf Chromosom 13 sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: : Zwei-Punkt LOD-scores in der Region auf Chromosom 13 im Kernstammbaum

Recombination fraction/Marker	0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
D13S175	-infinity	-0.48	0.32	0.56	0.55	0.36	0.17
D13S217	-infinity	-5.82	-2.75	-1.46	-0.42	-0.07	0.02
D13S171	-infinity	-4.15	-1.72	-0.74	-0.05	0.1	0.09
D13S263	-infinity	-7.04	-2.95	-1.38	-0.19	0.15	0.16
D13S153	-infinity	-7.06	-2.92	-1.35	-0.18	0.14	0.15
D13S156	-infinity	-2.2	-0.37	0.35	0.74	0.58	0.27
D13S1306	0.55	0.67	0.85	0.84	0.62	0.34	0.12
D13S789	-infinity	-2.84	-1.18	-0.4	0.16	0.25	0.16
D13S170	-infinity	1.94	2.29	2.14	1.53	0.83	0.26
D13S271	-infinity	0.13	1.17	1.38	1.19	0.77	0.33
D13S265	-infinity	0.67	1.56	1.71	1.44	0.92	0.39
D13S794	-infinity	-1	0.68	1.09	1.03	0.62	0.21
D13S795	-infinity	-1.93	-0.54	0	0.28	0.22	0.1
D13S1300	0.54	0.58	0.88	1	0.81	0.46	0.16
D13S129	3.67	3.69	3.56	3.2	2.25	1.21	0.39
D13S125	-0.29	-0.09	0.4	0.58	0.52	0.29	0.09
D13S254	-infinity	3.06	3.32	3.06	2.23	1.29	0.49
D13S154	-infinity	-1.2	0.49	1	1	0.56	0.14
D13S1241	-infinity	1.67	2.25	2.22	1.67	0.92	0.29
D13S786	-infinity	-2.54	-0.41	0.33	0.67	0.54	0.26
D13S159	-infinity	-1.82	0.19	0.81	0.95	0.67	0.3
D13S158	-infinity	-2.16	-0.22	0.43	0.63	0.39	0.12
D13S173	-infinity	-1.97	-0.65	-0.18	0.08	0.09	0.05
D13S285	-infinity	-5.04	-2.39	-1.22	-0.31	-0.03	0.02

Der maximale LOD-score betrug 3.69 bei Marker D13S129 bei einer Rekombinationsfrequenz von $\Theta = 0,01$. Im nächsten Schritt wurden 96 zur Verfügung stehende Personen für Marker aus diesen 8 chromosomalen Regionen genotypisiert. Die Zwei-Punkt LOD-score Analyse mit FASTLINK (Cottingham et al., 1993) ergab einen maximalen LOD-score in der gesamten Familie von 5.22 ebenfalls bei Marker D13S129 bei $\Theta = 0,05$. Betrachtet man in der Kopplungsanalyse nur die betroffenen Personen und führt eine *Affecteds only* Analyse durch ergaben sich LOD-scores, wie sie in Tabelle 6 dargestellt sind. Eine Multipoint-Analyse der Daten wurde durch die Komplexität des Stammbaums erschwert. Eine Drei-Punkt-Analyse mit FASTLINK ergab jedoch einen LOD-score von 5.67 in der Nähe von Marker D13S129.

Tab. 6: Zwei-Punkt LOD-scores bei 96 Familienmitgliedern mit Hilfe einer *Affecteds only* Analyse

Recombinations- Fraktion/ Marker	0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
D13S175	-0.41	-0.35	-0.17	-0.06	0.02	0.03	0.01
D13S217	-1.68	-1.54	-1.12	-0.78	-0.39	-0.18	-0.07
D13S171	-1.64	-1.51	-1.11	-0.79	-0.41	-0.2	-0.07
D13S263	-1.63	-1.42	-0.89	-0.51	-0.15	-0.01	0.03
D13S153	-2.84	-2.52	-1.67	-1.03	-0.37	-0.08	0.01
D13S156	-0.12	0.03	0.32	0.42	0.36	0.2	0.07
D13S1306	0.9	0.89	0.82	0.71	0.46	0.23	0.07
D13S789	0.69	0.67	0.6	0.5	0.33	0.18	0.07
D13S170	1.63	1.63	1.51	1.29	0.78	0.36	0.09
D13S271	1.59	1.54	1.34	1.11	0.68	0.34	0.11
D13S265	2.37	2.3	2	1.65	1.04	0.55	0.19
D13S794	1.34	1.3	1.15	0.96	0.58	0.27	0.07
D13S795	0.58	0.57	0.53	0.47	0.31	0.15	0.04
D13S1300	1.78	1.72	1.45	1.14	0.62	0.26	0.06
D13S129	1.96	1.9	1.67	1.36	0.8	0.38	0.11
D13S125	0.68	0.66	0.59	0.51	0.35	0.2	0.08
D13S254	1.48	1.49	1.42	1.25	0.83	0.44	0.15
D13S154	0.72	0.71	0.65	0.54	0.31	0.12	0.01
D13S1241	0.02	0.14	0.38	0.45	0.33	0.15	0.02
D13S786	0.71	0.77	0.86	0.82	0.6	0.33	0.12
D13S159	0.44	0.56	0.78	0.81	0.64	0.37	0.14
D13S158	-1.15	-1	-0.63	-0.39	-0.18	-0.09	-0.05
D13S173	0.46	0.44	0.38	0.31	0.19	0.09	0.02
D13S285	-0.5	-0.43	-0.25	-0.11	-0.01	-0.01	-0.02

Um die Limitierungen der eingesetzten Programme FASTLINK und GENEHUNTER (Krugylak et al., 1996) bei komplexen Stammbäumen zu umgehen, wurde eine nicht-parametrische Geschwisterpaar-Analyse durchgeführt. Diese nicht-parametrische Analyse hat den weiteren Vorteil, daß kein genetisches Modell und keine Angaben zu Frequenzen des Phänotyps zugrundegelegt werden müssen. Zu diesem Zweck wurde der Gesamtstammbaum in Kernfamilien, bestehend aus Geschwistern und ihren Eltern, unterteilt und die von Müller-Myhsok und Abel entwickelte MLB-Statistik benutzt (Abel und Müller-Myhsok, 1998). Diese Statistik geht von einer „maximum-likelihood-binomial“ Verteilung der elterlichen Allele bei den Geschwistern aus und erlaubt die Analyse von Geschwisterschaften mit mehr als zwei Geschwistern. Das Ergebnis der Multipoint-Analyse mit MLB ist in Abbildung 6 als schwarze Kurve dargestellt und erbrachte einen maximalen LOD-score von 4,82, entsprechend einem p-Wert von $1,26 \times 10^{-6}$ bei Marker D13S1241.

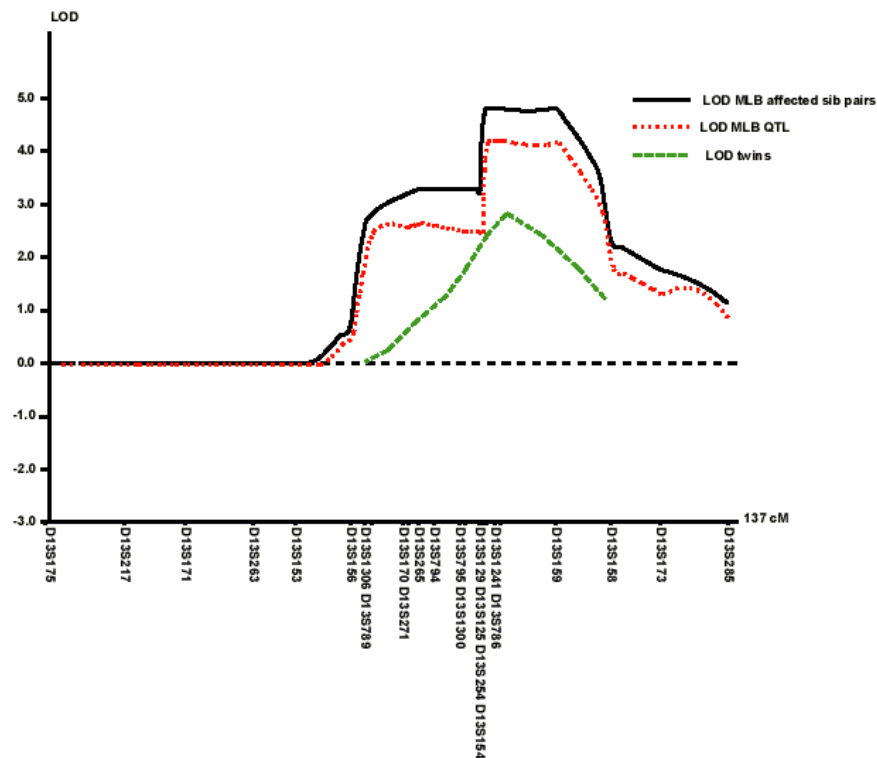


Abb. 6: Ergebnisse der Kopplungsanalysen mit Markern auf Chromosom 13. In schwarz ist die LOD-score Kurve mit Hilfe der *affected-sib-pair Analyse*, in rot die LOD-score-Kurve mit Hilfe einer *MLBQTL-sib-pair-Analyse* und in grün die LOD-score-Kurve mit Hilfe von Zwillingsstudien dargestellt.

In einer weiteren Analyse wurde getestet, ob diese Region auf Chromosom 13 als Quantitativer Trait Locus (QTL) für Lipidphänotypen in den Kernfamilien der arabischen Familie betrachtet werden kann. Für diese Analyse wurde MLBQTL, eine Erweiterung von MLB für quantitative Analysen, eingesetzt (Alcais und Abel, 1999). Das Ergebnis ist in Abbildung 6 als rot-gestrichelte Kurve dargestellt. Der maximale LOD-score mit MLBQTL war 4,32 bei Marker D13S794. Es konnte bestätigt werden, daß diese chromosomale Region genetische Information, die die Konzentration des LDLC's beeinflussen, enthält. Andere Orte innerhalb des gesamten Genoms ergaben keine signifikanten Hinweise für eine Kopplung. Die Region hat eine Größe von ca. 37 cM, definiert durch die " z_{\max} -2-Methode".

Um die Relevanz dieses Genorts auf Chromosom 13q in einer zweiten unabhängigen Stichprobe zu untersuchen und zu testen, ob dieser Genort auch für die Variabilität der Lipide im Normbereich verantwortlich ist, wurde eine QTL-Analyse an dizygoten Zwillingspaaren durchgeführt, die im Rahmen der Darstellung der Ergebnisse der Zwillingsanalysen gezeigt wird.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

Knoblauch H, Muller-Myhsok B, Busjahn A, Ben Avi L, Bähring S, Baron H, Heath SC, Uhlmann R, Faulhaber HD, Shpitzen S, Aydin A, Reshef A, Rosenthal M, Eliav O, Muhl A, Lowe A, Schurr D, Harats D, Jeschke E, Friedlander Y, Schuster H, Luft FC, Leitersdorf E. A cholesterol-lowering gene maps to chromosome 13q. *Am J Hum Genet.* 2000; 66:157-66.

2.2.2 Die familiäre kombinierte Hyperlipidämie (FCHL)

Die FCHL ist die häufigste Form genetisch bedingter Hyperlipidämien. Es wird geschätzt, daß die Häufigkeit der FCHL in Europa und den USA bei ca. 1 : 300 liegt und für ca. 10-20% aller Patienten mit einer koronaren Herz-Erkrankung vor dem 60. Lebensjahr verantwortlich ist. Klinisch ist die FCHL durch Erhöhungen des LDLC's und der Triglyzeride charakterisiert, wobei wechselnde Muster der Hyperlipidämie beobachtet werden können. Das Muster der Hyperlipidämie kann sowohl innerhalb von Familien unterschiedlich sein als auch bei einer Person zu verschiedenen Zeitpunkten wechseln (Eurelings et al., 2001). Obwohl die FCHL bereits seit über 25 Jahren beschrieben ist, ist der Vererbungsmodus unklar. Ursprünglich wurde von einem autosomal dominanten Erbgang ausgegangen. Heutzutage geht man jedoch eher davon aus, daß es sich bei der FCHL um einen komplexen Phänotyp handelt. Die Ursache der FCHL ist heterogen und eine Reihe von Kandidatengenen wurde mit der FCHL in Zusammenhang gebracht (Pei et al., 2000). Im Rahmen eines Genom-weiten Scans wurde kürzlich eine Region auf Chromosom 1q21-q23 identifiziert, die mit TGL, TC und Apolipoprotein B-Konzentrationen gekoppelt ist (Pajukanta et al., 1999). Im Rahmen der folgenden Untersuchung wurde eine Kopplungsanalyse mit Markern aus der chromosomalen Region 1q21-q23 in deutschen und chinesischen Familien durchgeführt, um zu testen, ob die Ergebnisse von Pajukanta et al. repliziert werden können.

2.2.2.1 Familien aus Deutschland und China mit familiärer kombinierter Hyperlipidämie (FCHL)

Zusammen mit dem „Sino-German Laboratory for Molecular Medicine“ des „Fu Wai Heart Hospital and Cardiovascular Institute“ der „Chinese Academy of Medical Sciences“ wurden 12 chinesische und 24 deutsche Familien mit familiärer kombinierter Hyperlipidämie untersucht. Die demographischen Daten der deutschen und chinesischen Familien sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 dargestellt. Das Alter und die Lipidphänotypen unterscheiden sich nur gering zwischen chinesischen und deutschen Familien. Der BMI bei chinesischen Individuen war geringer.

Tab. 7: Demographische Daten der deutschen Familien mit FCHL. ** $p < 0.01$ zeigt signifikante Unterschiede zwischen betroffenen und nicht-betroffenen Familienmitgliedern an.

Variable	Gesamt (MW \pm SD)	Betroffen (MW \pm SD)	Nicht-Betr. (MW \pm SD)
N (Personen)	133	92	41
Alter (Jahre)	39.3 \pm 17.4	38.50 \pm 17.54	41.20 \pm 17.19
Geschlecht (männ./weibl.)	66/67	55/37	11/30
BMI	25.31 \pm 5.16	25.49 \pm 6.09	24.26 \pm 4.24
TC (mmol/l)	6.20 \pm 1.57	6.57 \pm 1.66	5.36 \pm 0.89**
TGL (mmol/l)	2.47 \pm 3.85	3.03 \pm 4.51	1.24 \pm 0.54 **
HDLc (mmol/l)	1.23 \pm 0.39	1.14 \pm 0.37	1.42 \pm 0.37 **
LDLC (mmol/l)	3.71 \pm 1.51	3.95 \pm 1.67	3.16 \pm 0.87 **

Tab. 8: Demographische Daten der chinesischen Familien mit FCHL. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ zeigt signifikante Unterschiede zwischen betroffenen und nicht-Betroffenen Familienmitgliedern an.

Variable	Gesamt (MW \pm SD)	betroffen (MW \pm SD)	nicht-betroffen (MW \pm SD)
N (Personen)	81	45	36
Alter (Jahre)	41.36 \pm 18.15	45.00 \pm 18.24	36.81 \pm 17.23
Geschlecht (männ./weibl.)	39/42	26/19	13/23
BMI	23.36 \pm 4.35	24.20 \pm 4.48	22.32 \pm 4.00
TC (mmol/l)	5.74 \pm 1.57	6.65 \pm 1.44	4.62 \pm 0.84**
TGL (mg/dl)	2.10 \pm 1.66	2.90 \pm 1.85	1.11 \pm 0.41**
HDLc (mmol/l)	1.03 \pm 0.28	0.98 \pm 0.29	1.10 \pm 0.24*
LDLC (mmol/l)	3.74 \pm 1.62	4.39 \pm 1.78	2.92 \pm 0.89 **

Als betroffen wurden 92 deutsche Familienmitglieder klassifiziert, wenn die LDLc und TGL-Konzentrationen über der 90. Perzentile lagen. Diese Kriterien sind identisch mit denen, die Pajukanta (1998) zur Klassifikation benutzt hat. So wurde eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse möglich. Da Alters- und Geschlechtsspezifische LDLc- bzw. TGL-Werte für die chinesische Bevölkerung nicht zur Verfügung standen, wurden die 45 chinesischen Familienmitglieder als betroffen klassifiziert, wenn das LDLc < 6.20 mmol/l und TGL > 2.82 mmol/l war. Diese Grenzwerte liegen deutlich oberhalb der 90. Perzentile deutscher Vergleichswerte.

2.2.2.2 Kopplungsanalyse bei Familien mit familiärer kombinierter Hyperlipidämie

Es wurde eine Kopplungsanalyse mit den Markern APOA2, D1S104, D1S1677, D1S194, D1S426 und D1S196 durchgeführt. Die Multipoint Linkageanalyse ergab einen maximalen LOD-score von 2.17 bei APOA2. Der Anteil der Familien, die an diesen Ort gekoppelt ist, betrug 71%. Die Zwei-Punkt-Linkage Analyse, die Heterogenität zuließ (HLOD), ergab einen maximalen LOD-score von 2.6 über D1S194 bei 35% der Familien. Dabei waren ca. 25% der deutschen Familien (HLOD = 1,4) und 65% der chinesischen Familien (HLOD = 1,52) gekoppelt. Die Ergebnisse der parametrischen LOD-score Analyse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 9: LOD-scors der parametrischen LOD-score Analyse mit HLOD, einem Linkage-Programm, das Heterogenität zwischen den Familien zulässt; in Klammern ist der Anteil der gekoppelten Familien in Prozent dargestellt.

Marker	Alle Familien	Deutsche Familien	Chinesische Familien
APOA2	0.04 (0.84)	0.00 (0.00)	0.51 (0.45)
D1S1677	0.49 (0.36)	0.08 (1.00)	1.35 (1.00)
D1S104	0.24 (1.00)	0.06 (1.00)	0.27 (1.00)
D1S194	2.60 (0.36)	1.40 (0.25)	1.52 (0.65)
D1S426	0.05 (0.02)	0.05 (0.06)	0.38 (1.00)
D1S196	0.16 (0.11)	0.13 (0.05)	0.00 (0.26)

Als nicht-parametrische Analyse wurde ein TDT (Transmission Disequilibrium Test) durchgeführt, der in den deutschen Familien ein signifikantes Ergebnis mit D1S426 ergab, während in den chinesischen Familien kein signifikantes Ergebnis gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse des Genom-weiten Scans von Pajukanta et al. (1999), die eine Kopplung von FCHL mit Markern auf Chromsom 1q fanden, bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

*Pei W, Baron H, Muller-Myhsok B, **Knoblauch H**, Al-Yahyaee SA, Hui R, Wu X, Liu L, Busjahn A, Luft FC, Schuster H. Support for linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23 in Chinese and German families. Clin Genet. 2000 ;57:29-34*

2.3 Zwillingsuntersuchungen innerhalb des Lipidstoffwechsels

Mit Hilfe der Zwillingskohorte, die an der Franz-Volhard-Klinik am Max-Delbrueck-Centrum durch Herrn Dr. habil. Busjahn betreut wird, wurden QTL-Analysen durchgeführt, um zu testen, ob ein Genort für die Variabilität eines Phänotyps verantwortlich ist und wie groß die Heritabilität der Lipidphänotypen ist. Für den Einsatz von dizygoten Zwillingen anstelle von Geschwisterpaaren für die Analyse quantitativer Phänotypen gibt es mehrere Argumente: die Altersübereinstimmung, die Übereinstimmung für intrauterine vorgeburtliche Einflüsse, die größere Übereinstimmung für Umweltfaktoren durch den größeren Anteil gemeinsam verbrachter Zeit, die gleiche Stellung innerhalb der Geschwisterreihe, die geringe Wahrscheinlichkeit falscher Vaterschaften für ein Paarmitglied und nicht zuletzt die größere Bereitschaft zur Teilnahme an genetischen Studien durch den bewußten Sonderstatus als Zwilling.

2.3.1 Zwillingspopulation

Grundlage der Zwillingsuntersuchungen ist eine Stichprobe von monozygoten (MZ) und dizygoten (DZ) Zwillingen. Die Teilnehmer wurden im Laufe der letzten Jahre durch unterschiedliche Quellen unter der Leitung von Herrn Dr. habil. Andreas Busjahn an der Franz-Volhard-Klinik am Max-Delbrueck-Zentrum für Molekulare Medizin rekrutiert. Sie kommen aus allen Teilen Deutschlands. Aus einer Gesamtstichprobe von mehr als 2000 Zwillingspaaren wurden bislang mehr als 200 Zwillingspaare nach schriftlicher Einverständniserklärung zur Teilnahme an medizinischen Untersuchungen in die aktuellen Untersuchungen einbezogen. Eingeschlossen wurden Zwillinge, bei denen keine bekannte Erkrankung (z.B. Bluthochdruck, koronare Herzerkrankung) und insbesondere keine Fettstoffwechselstörung vorlag und die keine Medikamente nahmen, die den Fettstoffwechsel beeinflussen.

Die demographischen Daten sind in Tabelle 10 dargestellt. Das mittlere Alter beträgt 35 Jahre, 32% der Teilnehmer sind männlich, monozygote Zwillinge sind mit 55% überrepräsentiert. Der relativ geringe Anteil an männlichen Teilnehmern und dizygoten Zwillingen ist ein typisches Phänomen bei Zwillingsuntersuchungen mit Rekrutierung durch öffentliche Aufrufe.

Tab. 10: Demographische Angaben zur Stichprobe. MZ = monozygote Zwillinge; DZ = dizygote Zwillinge.

	MZ	DZ
N	244	200
Alter (Jahre)	34±15	34±13
Geschlecht M/W	80/164	60/140
Größe, cm	169±9	170±9
Gewicht, kg	67±13	71±14
BMI, kg/m ²	23±4	24±4

Die Lipidanalysen erfolgten an der Franz Volhard Klinik, nachdem den Probanden morgens nüchtern Blut für die entsprechenden Untersuchungen abgenommen wurde. Die Untersuchung beinhaltete weiterhin eine klinische Grunduntersuchung, eine Erhebung von Eigenanamnese und Familienanamnese zu Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen, Herzinfarkt, Schlaganfall sowie sonstigen chronischen Erkrankungen. Es erfolgte eine Bestimmung von Körpergröße, Gewicht, Bauch- und Hüftumfang, des EKGs, eine Echokardiographie und Blutdruckmessungen unter verschiedenen Ruhe- und Streßbedingungen. Die Lipidwerte der untersuchten Zwillinge sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tab. 11: Tabelle 11: Lipidwerte der untersuchten Zwillinge. MZ = monozygote Zwillinge; DZ = dizygote Zwillinge. SD = Standardabweichung. Cholesterin: mmol/L=0.01129*mg/dl, Triglyzeride: mmol/L=0.0286*mg/dl

Variable	MZ (MW ± SD)	DZ (MW ± SD)
n (Paare)	122	100
Gesamtcholesterin (mg/dl)	183 ± 39	193 ± 42
HDL-Cholesterin (mg/dl)	51 ± 14	57 ± 17
LDL-Cholesterin (mg/dl)	115 ± 34	115 ± 32
Triglyzeride (mg/dl)	87 ± 67	100 ± 64

2.3.2 Heritabilitätsberechnungen für Lipidphänotypen

Durch den Vergleich der Phänotypen von monozygoten und dizygoten Zwillingen kann die Heritabilität eines Phänotyps ermittelt werden. Die Heritabilität ist definiert als der Anteil der Varianz, der durch genetische Faktoren beeinflusst wird. Für TC, LDLC, HDLC und TGL konnten signifikante genetische Einflüsse nachgewiesen werden. Die Heritabilität (h^2) lag zwischen 59% und 72% (Tabelle 12). Auf Grund des Nachweises, daß bis zu 72% der phänotypischen Varianz der Lipidwerte durch genetische Faktoren beeinflusst wird, wird im Folgenden dargestellt, wie einzelne Kandidatengene des Lipidstoffwechsel zu der phänotypischen Varianz beitragen.

Tab. 12: Genetische und Umwelteinflüsse auf die Lipidwerte bei MZ und DZ Zwillingen. h^2 ist die Heritabilität (Anteil der genetischen Varianz an der Gesamtvarianz); e^2 ist der Anteil von nicht-genetischen Faktoren an der Gesamtvarianz; der p-Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit.

	genetische Einflüsse (h^2)	Umwelt-einflüsse (e^2)	p-Wert
Gesamt-Cholesterol	0.64	0.36	0.01
HDL- Cholesterol	0.59	0.41	0.01
LDL –Cholesterol	0.66	0.34	0.01
Triglyceride	0.72	0.28	0.01

2.3.3 QTL-Analysen mit Kandidatengenen des Lipidstoffwechsels

Für diese Analysen werden Mikrosatellitenmarker aus den entsprechenden chromosomalen Regionen genotypisiert und mit Hilfe von Kopplungs- und Assoziationsstudien auf die Kopplung bzw. die Assoziation mit Lipidphänotypen untersucht. Im folgenden werden die Ergebnisse der QTL-Analysen

1. für die Region auf Chromosom 13, die ein Cholesterin-senkendes Gen enthält (Knoblauch et al., 2000);
2. für eine Region auf Chromosom 8, die die Gene für die Lipoprotein Lipase und den Makrophagen-Scavenger-Rezeptor (Knoblauch et al., 1997); und
3. für eine Region auf Chromosom 3, die das PPAR γ -Gen enthält (Knoblauch et al., 1999),

dargestellt.

2.3.3.1 QTL-Analyse für die Region auf Chromosom 13, die ein Cholesterin-senkendes Gen enthält

Nachdem mit Hilfe einer arabischen Familie eine Region auf Chromosom 13q beschrieben wurde, die ein Cholesterin-senkendes Gen enthält, stellt sich die Frage, ob dieser Genort auch für die Variabilität der Lipide im Normbereich in einer unabhängigen Stichprobe dizygoter Zwillinge verantwortlich ist. Acht Mikrosatellitenmarker wurden in einer Stichprobe von 100 dizygoten Zwillingspaaren genotypisiert und eine Geschwisterpaar-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13: Ergebnisse der Kopplungsanalyse mit Mikrosatellitenmarkern. Die Irrtumswahrscheinlichkeit ist als p-Wert ausgedrückt.

Model	χ^2 -Wert	p-Wert
Gesamtcholesterin	13,63	0,0002
HDL-Cholesterin	8,2	0,004
LDL-Cholesterin	13,6	0,0002
Triglyzeride	6,39	0,011
BMI	14,26	0,0001

Für alle Lipidphänotypen und für den BMI konnte eine signifikante Kopplung mit Markern in diesem Bereich gezeigt werden. Der maximale p-Wert dieser Analyse liegt im gleichen Bereich wie der maximale LOD-score der Kopplungsanalyse innerhalb der arabischen Familie (grüne Kurve in Abbildung 6). Diese chromosomale Region beeinflusst somit die Variabilität der Lipidwerte in einer Stichprobe mit normalen Lipidwerten. Weiterhin konnte berechnet werden, daß dieser Genort ca. für 26% der Variabilität des LDL-Cholesterins verantwortlich ist, obwohl einschränkend bemerkt werden muß, daß das Konfidenzintervall von 22% bis 95% reicht. Es handelt sich bei dem Genlokus auf Chromosom 13q also um eine Region, die sowohl bei einer arabischen Familie als auch bei einer Stichprobe gesunder Zwillinge einen signifikanten Einfluß auf die Lipidwerte und insbesondere auf das LDL-Cholesterin hat

Knoblauch H, Müller-Myhsok B, Busjahn A, Ben Avi L, Bähring S, Baron H, Heath SC, Uhlmann R, Faulhaber HD, Shpitzen S, Aydin A, Reshef A, Rosenthal M, Eliav O, Mühl A, Lowe A, Schurr D, Harats D, Jeschke E, Friedlander Y, Schuster H, Luft FC, Leitersdorf E. A cholesterol-lowering gene maps to chromosome 13q. *Am J Hum Genet.* 2000; 66:157-66.

2.3.3.2 QTL-Analyse für die Region auf Chromosom 8, die die Lipoprotein-Lipase und den Makrophagen Scavenger Rezeptor enthält

Die folgende Abbildung zeigt die chromosomale Organisation eines Bereichs auf Chromosom 8, der die Gene für die Lipoprotein-Lipase (LPL) und den Makrophagen-Scavenger-Rezeptor (MSR) enthält. Fünf Mikrosatellitenmarker wurden genotypisiert und ihre Beziehung zu Lipidphänotypen wurde mit Hilfe der QTL-Kopplungsanalyse bei dizygoten Zwillingen getestet.

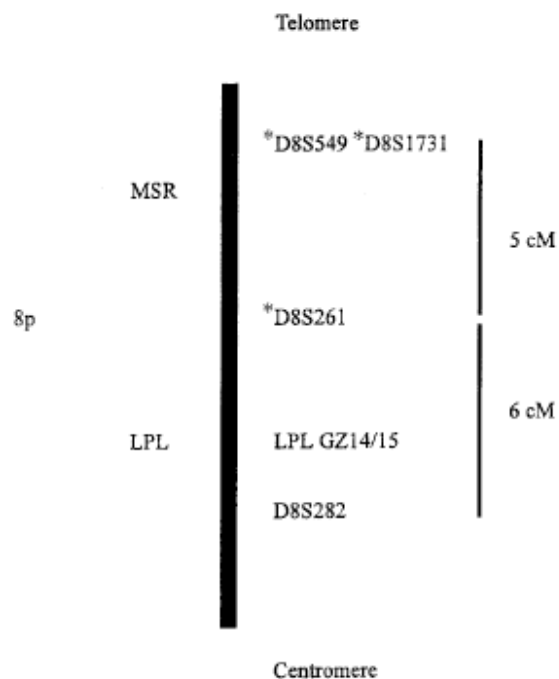


Abb. 7: Genetische Karte eines Bereichs auf Chromosom 8p des Menschen. MSR = Makrophagen-Scavenger-Rezeptor; LPL = Lipoprotein-Lipase; cM = centi Morgan.

Durch Kopplungsanalysen konnte gezeigt werden, daß ein QTL im Bereich des Makrophagen Scavenger Rezeptors liegt, der die Konzentration von HDL-Cholesterin beeinflusst ($p < 0.001$) und grenzwertig signifikant die Triglyzerid-Konzentration ($p = 0,05$) beeinflusst. Mikrosatellitenmarker in der Nähe der Lipoprotein Lipase zeigten keine Kopplung zu Lipidphänotypen.

Knoblauch H, Busjahn A, Münter S, Nagy Z, Faulhaber HD, Schuster H, Luft FC. Heritability analysis of lipids and three gene loci in twins link the macrophage scavenger receptor to HDL cholesterol concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2054-60.

2.3.3.3 QTL-Analyse für eine Region auf Chromosom 3, die das PPAR γ -Gen enthält

Das Peroxisome-Proliferator-Activated-receptor- γ -Gen (PPAR γ) ist ein Mitglied der Kernrezeptor Superfamilie, das mit dem Retinoid-X-Rezeptor ein Heterodimer bildet. PPAR γ ist ein Regulator der Transkription von Genen des Lipidstoffwechsels und des Energiehaushalts (Chawla, 2001).

Acht Mikrosatellitenmarker, die den Bereich auf Chromosom 3 umspannen, in dem das PPAR γ -Gen liegt, wurden genotypisiert und ihre Beziehung zu Lipidphänotypen wurde mit Hilfe der QTL-Kopplungsanalyse bei dizygoten Zwillingen getestet. PPAR γ zeigte eine *Kopplung* mit LDLC ($p < 0,005$), HDLC ($p < 0,0009$) und dem BMI ($p < 0,005$ (Knoblauch et al., 1999).

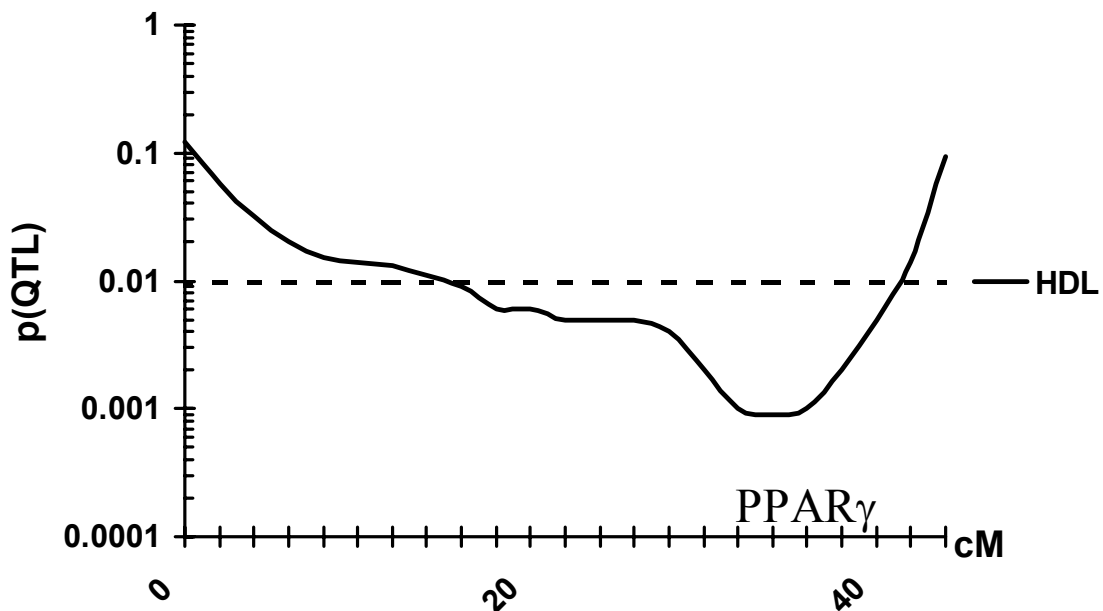


Abb. 8: Kopplung zwischen Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 3 und HDL-Cholesterin. Die Ordinate gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen Zusammenhang (Kopplung) an, die Abszisse beschreibt den untersuchten Chromosomenabschnitt.

Zusätzlich zu den untersuchten Mikrosatellitenmarkern wurde ein Polymorphismus im Exon 6 des PPAR γ -Gens untersucht. Dieser Polymorphismus führt nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz und wird als *non-synonymous SNP* bezeichnet. Die Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der Assoziationanalyse zwischen dem SNP und HDLC). Es konnte eine *Assoziation* zu HDLC ($p < 0.001$) und BMI ($p < 0.03$) gezeigt werden.

Homozygote Träger des T-Allels haben höhere HDLC-Werte als heterozygote Träger und homozygote Träger des C-Allels.

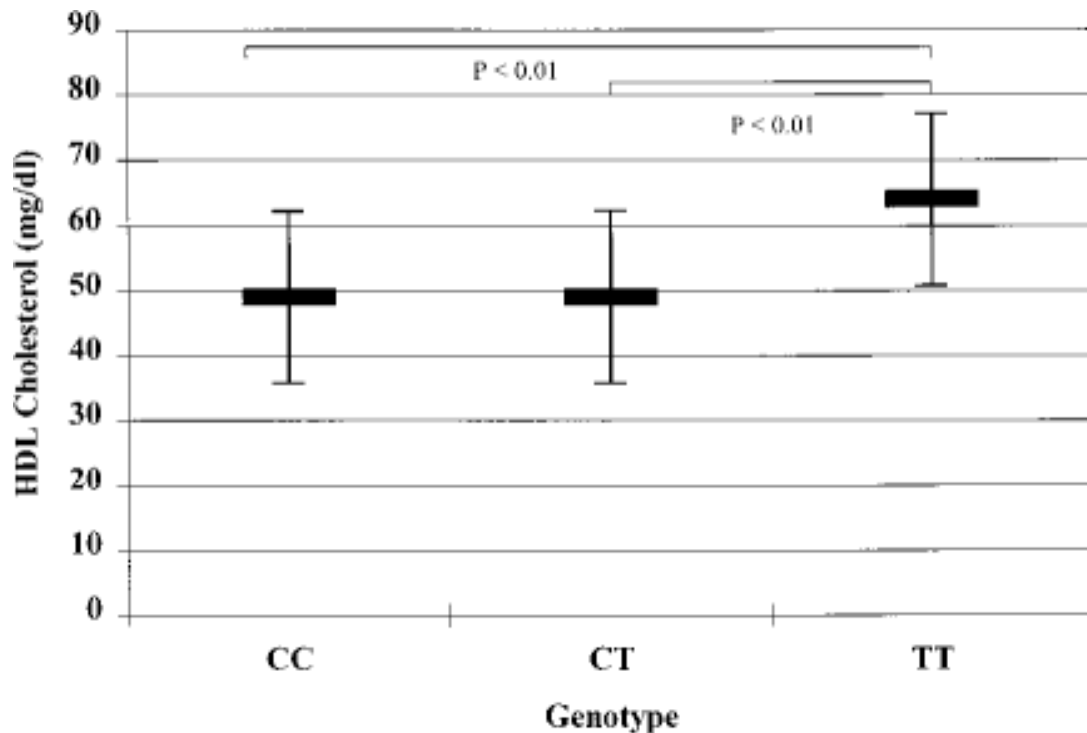


Abb. 9: Ergebnisse der Assoziationsanalyse mit einem SNP im PPAR γ -Gen und HDLC.

Bei der Analyse der Kopplungsdaten mit Mikrosatelliten, die das PPAR γ -Gen flankieren, wurde zusätzlich zu der Kopplung und Assoziation mit HDLC eine Abweichung zwischen der erwarteten und der beobachteten genetischen Übereinstimmung (IBD) bei den dizygoten Zwillingen beobachtet. Im folgenden wurde der Status *dizygoter Zwilling* als qualitativer Phänotyp definiert. Die Ergebnisse der Kopplungsanalyse sind in Abbildung 10 dargestellt und zeigen einen Zusammenhang zwischen dem Merkmal *dizygoter Zwilling* und der PPAR γ -Region auf Chromosom 3 (LOD=6.93) (Busjahn, Knoblauch et al., 2000). Aus diesen Ergebnissen wurde die Hypothese abgeleitet, daß eine genotypische Übereinstimmung am PPAR γ -Genlocus ein Überlebensvorteil für die Zwillinge ist, während eine Nicht-Übereinstimmung die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß ein Zwilling früh während der embryonalen Entwicklung stirbt (das Phänomen des *vanishing twin*).

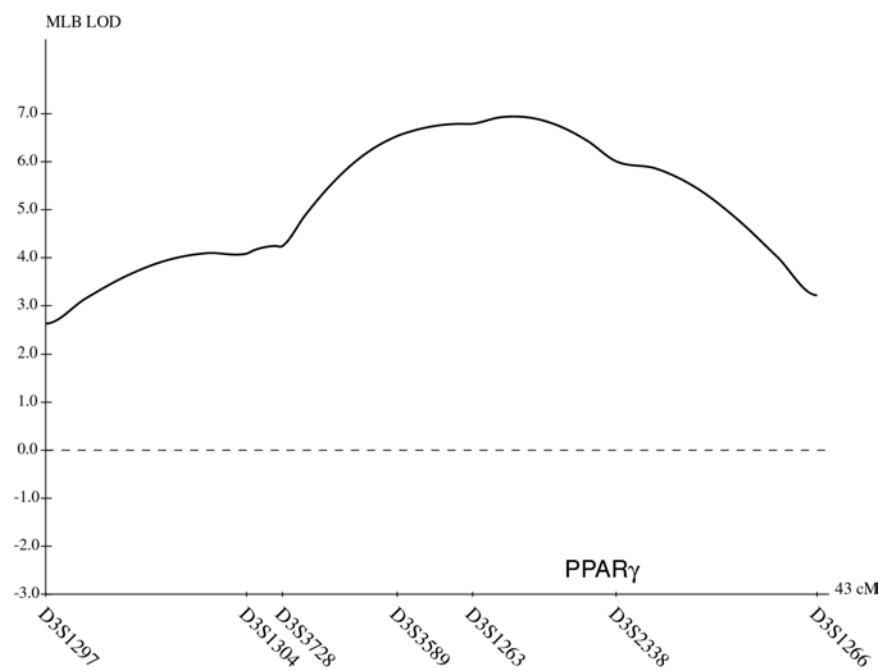


Abb. 10: LOD-score Kurve der Kopplungsanalyse mit dem Phänotyp *dizygoter Zwilling* und dem PPAR γ -Lokus

Knoblauch H, Busjahn A, Muller-Myhsok B, Faulhaber HD, Schuster H, Uhlmann R, Luft FC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene locus is related to body mass index and lipid values in healthy nonobese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2940-4.

Busjahn A, **Knoblauch H**, Faulhaber HD, Aydin A, Uhlmann R, Tuomilehto J, Kaprio J, Jedrusik P, Januszewicz A, Strelau J, Schuster H, Luft FC, Müller-Myhsok B. A region on chromosome 3 is linked to dizygotic twinning. *Nat Genet.* 2000;26:398-9.

2.4 Familienbasierte Assoziationsstudien an einer Bevölkerungsstichprobe

Um den Beitrag einzelner Gene des Lipidstoffwechsels an der Gesamtvariabilität der Lipidphänotypen zu untersuchen, wurde eine Stichprobe ausgewählt, deren Lipidphänotypen vergleichbar mit denen anderer großer epidemiologischer Stichproben, wie z.B. der PROCAM- oder der Framingham-Kohorte, sind. Es wurden 28 SNPs in 6 Lipidgenen ausgewählt und bei 184 Familien mit 732 Personen genotypisiert. Die Genotyp-Phänotyp-Assoziation wurde mit Hilfe einer Varianzkomponenten-Analyse getestet. Bevor die Ergebnisse vorgestellt werden, wird das Prinzip der Varianzkomponenten Analyse kurz erläutert.

2.4.1 Varianzkomponenten-Analyse

Mit Hilfe von Varianzkomponenten-Analysen kann der Anteil der phänotypischen Varianz, die durch die genetische Varianz erklärt wird, untersucht werden. Die Logik dieser Analyse besteht in einer Erweiterung der klassischen Zwillingsanalysen. Die Gesamtvarianz eines Phänotyps wird aufgeteilt in die Umweltvarianz (V_e) und die genetische Varianz (V_g). In einem zweiten Schritt wird der genetische Einfluß aufgespaltet in die Varianz, die durch den untersuchten Locus bedingt ist (V_{QTL}) und in die Varianz des genetischen Hintergrundes (V_{addGen}). Die Gesamtvarianz lässt sich folgendermaßen darstellen:

$$\begin{aligned} V_{ges} &= V_e + V_g & V_g &= V_{QTL} + V_{addGen} \\ V_{ges} &= V_{QTL} + V_{addGen} + V_e \end{aligned}$$

Die erwartete Kovarianz (der Anteil der Varianz, der bei zwei Gruppen oder Individuen gemeinsam auftritt, z.B. gemeinsame genetische Faktoren) ist bei familienbasierten Assoziationsstudien abhängig vom Grad der genetischen Übereinstimmung, ausgedrückt als *Identical-by-descent-Status* (IBD):

$$\begin{aligned} \text{COV}_{IBD0} &= 0.5 V_{addGen} \\ \text{COV}_{IBD1} &= 0.5 V_{QTL} + 0.5 V_{addGen} \\ \text{COV}_{IBD2} &= V_{QTL} + 0.5 V_{addGen} \end{aligned}$$

In einer Modellanalyse werden anhand der empirischen Varianzen und Kovarianzen die Parameter für den relativen Einfluß von putativem QTL (Quantitativer Trait Locus) und genetischem Hintergrund bestimmt. Die Wahrscheinlichkeiten für die genetische

Übereinstimmung für 0, 1 und 2 Allele werden als Gewichtungsfaktoren für die drei Analysegruppen verwendet. Die Signifikanz des QTL-Effekts (Kopplung) wird durch Vergleich der Anpassungsgüte von Modellen mit und ohne QTL-Effekt getestet. Nachdem der Einfluß eines Genortes getestet wurde, kann zusätzlich der Einfluß einzelner allelischer Varianten innerhalb dieses Gens geschätzt werden. Die Beziehung zwischen Allelvarianten, z.B. SNPs oder Haplotypen (A_1A_1 , A_1A_2 und A_2A_2) und quantitativen Meßwerten läßt sich durch varianzanalytischen Vergleich zwischen den drei Genotypen nachweisen.

Der Vorteil von familienbasierten Assoziationsstudien besteht darin, daß falsch positive Ergebnisse durch Populationsstratifizierung nachgewiesen werden können, die dadurch entstehen, wenn sich die Stichprobe aus mehreren Populationen zusammensetzt, zwischen denen Unterschiede in den Allelfrequenzen sowie der Phänotypverteilung auftreten. Durch die getrennte Analyse der Varianz innerhalb von Familien und zwischen Familien kann mit Hilfe der Varianzkomponentenanalyse nach Hinweisen auf diese Populationsstratifizierung gesucht werden. Die verwendeten Programme sind auf der folgenden Internet-Seite zugänglich: <http://www.well.ox.ac.uk/asthma/QTDT> und sind in folgenden Veröffentlichungen detailliert beschrieben: Fulker et al. 1999; Sham et al., 2000; Abecasis et al., 2000a; Abecasis et al., 2000b; Almasy et al., 1999.

2.4.2 Studienpopulation für eine familienbasierte Assoziationsstudie

In vorhergegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, daß ein großer Prozentsatz der Variabilität der Lipidwerte innerhalb des Normbereichs auf genetische Faktoren zurück zu führen ist (Knoblauch et al., 1997). Aus diesem Grund wurden 184 Familien aus einem Probandenkollektiv ausgewählt, das während der letzten Jahre an der Franz-Volhard Klinik von der „Genetic Fieldworking Unit“ im Rahmen einer prospektiven Kohorten-Studie rekrutiert wurde (Schuster et al., 1998). Von allen Probanden liegt eine schriftliche Einverständniserklärung vor. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte über einen Patienten mit einer koronaren Herz-Erkrankung, die durch eine Herz-Katheder-Untersuchung bestätigt wurde. Diese Patienten selbst wurden nicht als Probanden in die vorgestellte Analyse einbezogen. Ausgehend von den Index-Patienten wurden Familienmitglieder zweiten oder höheren Grades und Verwandte der (Ehe-) Partner der Index-Patienten ausgewählt. Probanden, bei denen eine familiäre Lipidstoffwechselstörung, eine bekannte sekundäre Hyperlipidämie vorliegt, oder eine

bekannte klinisch manifeste Arteriosklerose vorliegt wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die Verteilung der Lipidphänotypen in dieser Population entspricht der Verteilung der Lipidwerte in anderen populationsbasierten Studien, wie z.B. der PROCAM-Studie oder der Framingham-Studie. Das Ziel war es, eine bevölkerungsrepräsentative Studienpopulation ohne Probanden mit Extremwerten auszuwählen. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich alle Probanden, deren Lipidphänotypen ober- bzw. unterhalb von 0,25% der Verteilungskurve lagen, ausgeschlossen. Die Tatsache, daß die Probanden über einen Index-Patienten mit einer koronaren Herz-Erkrankung rekrutiert wurden, kann zu einem Ascertainment-Fehler gegenüber Personen mit Verwandten mit koronarer Herz-Erkrankung führen. Da die Arteriosklerose jedoch so häufig ist, ist die Wahrscheinlichkeit einen Verwandten mit einer koronaren Herz-Erkrankung zu haben, auch ohne diese Art des *Recruitment* sehr hoch. Weiterhin liegt der Hauptfokus der vorgestellten Analysen auf der Genetik des Lipidstoffwechsels und nicht auf der Genetik der Arteriosklerose. Von allen Probanden der Kohorte wurden die Serumlipidwerte (Gesamtcholesterin, LDL-C, HDL-C und TG) bestimmt und aus 10 ml EDTA-Blut DNA extrahiert.

Tabelle 14 zeigt die Lipidwerte, das Alter und den BMI der 732 Probanden aus 184 Familien von denen Lipidphänotypen vorlagen entsprechend ihrer Position innerhalb der Familie.

Tab. 14: Lipidphänotypen, dargestellt in zwei Generationen und getrennt nach Müttern und Vätern, Söhnen und Töchtern.

		Alter	TC	HDL	LDL	LDL/HDL	TGL	BMI
	n	(Jahre)	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	kg/m ²
Väter	119	52±12	236±47	47±13	153±41	3.5±1.3	195±213	27.2±3.4
Mütter	141	50±12	233±49	58±14	148±46	2.7±1.3	131±71	26.1±4.2
Söhne	216	29±14	194±38	49±13	122±33	2.7±1.1	108±61	23.8±4.2
Töchter	256	30±15	195±33	57±13	120±29	2.3±0.8	91±35	23.1±4.8
Gesamt	732	37±17	209±45	53±14	131±39	2.7±1.2	121±104	24.6±4.6

Abbildung 11 zeigt die Häufigkeitsverteilung und die Alters- und Geschlechtsabhängigkeit exemplarisch für das LDL-Cholesterin. Da die Lipidwerte, insbesondere TGL nicht normal-verteilt war, wurden die Lipidphänotypen zusätzlich log-transformiert.

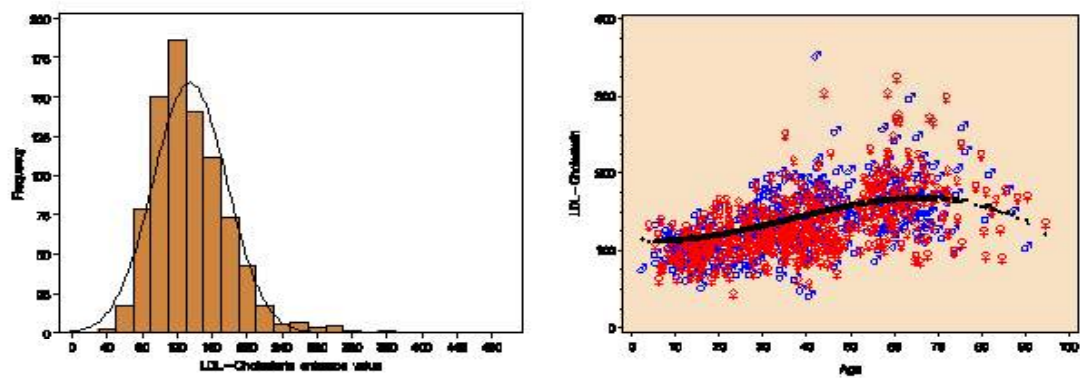


Abb. 11: Im linken Teil der Abbildung ist die Häufigkeitsverteilung der LDLC-Konzentrationen dargestellt. Im rechten Teil der Abbildung ist die Abhängigkeit des LDLC's vom Alter dargestellt. Männer sind in blau, Frauen in rot markiert.

Da das Alter und das Geschlecht einen Effekt auf die Lipidwerte haben, wurde eine Regressionsanalyse zur Quantifizierung des Einflusses dieser Parameter durchgeführt und die Lipidwerte entsprechend korrigiert, wenn die Regressionskoeffizienten einen signifikanten Einfluß hatten (Tabelle 15). Für die Analysen wurden die alters- und geschlechtskorrigierten Werte verwendet.

Tab. 15: zeigt die Ergebnisse einer Regressionsanalyse und den Einfluß von Alter, Alter², Alter³ und Geschlecht auf die Lipidwerte.

		Signifikante Einflußgrößen		
			Alter ²	Alter ³
Cholesterin				
Triglyzeride	Geschlecht	Alter		
HDL	Geschlecht			
LDL	Geschlecht	Alter	Alter ²	Alter ³
LDL/HDL	Geschlecht	Alter	Alter ²	Alter ³

Zunächst wurde die Varianz der Lipidphänotypen innerhalb der und zwischen den Familien verglichen. Die Varianz der Lipide war innerhalb der Familien deutlich geringer als zwischen Familien. Dies ist ein Hinweis auf die gemeinsamen genetischen bzw. Umweltfaktoren von Familienmitgliedern im Vergleich zu nicht-verwandten Personen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tab. 16: Analyse der Varianz der Lipidphänotypen innerhalb und zwischen Familien. Die Varianz zwischen Familien ist deutlich größer als die Varianz innerhalb von Familien. SSQt und SSQi beziehen sich auf die “sum of squares” von einem Mittelwert 0.

Phänotyp	Variation		SSQ _z SSQ _i	Empirischer F-Wert
TC	Zwischen Familien	In Familien	0.39 0.61	1,70 (p<0,0001)
TGL	Zwischen Familien	In Familien	0.34 0.66	1,32 (p=0,005)
HDL	Zwischen Familien	In Familien	0.43 0.57	1,98 (p<0,0001)
LDL	Zwischen Familien	In Familien	0.42 0.58	1,82 (p<0,0001)
LDL/HDL	Zwischen Familien	In Familien	0.42 0.58	1,84 (p<0,0001)

2.4.3 SNPs, Haplotypen und Linkage Disequilibrium

Als Marker wurden SNPs aus SNP-Datenbanken und der Literatur nach mehreren Kriterien ausgewählt. Berücksichtigt wurden bei der Auswahl die Häufigkeit des selteneren Allels (wenn möglich >5%), die Lokalisation der SNPs (Exon, Intron, Promotor), die Art des Basenaustauschs (synonym – nicht synonym) und die Verteilung der SNPs über das gesamte Gen. Der SNP-Name, das Gen, in dem der SNP lokalisiert ist, die Position und die Art des Nukleotid- und Aminosäureaustauschs sind in Tabelle 17 gezeigt. Die Häufigkeit der Allele wurde anhand einer Stichprobe unverwandter Personen ermittelt und variierte zwischen 0 und 49%. Das Hardy-Weinberg-Equilibrium war für alle SNPs erfüllt, was als Hinweis für die Einhaltung der Voraussetzungen des Hardy-Weinberg-Equilibriums gewertet wurde (eine große Population; Panmixie, d.h. jedes Individuum hat die gleiche Chance, sich mit jedem Individuum des anderen Geschlechts fortzupflanzen; keine Mutationen, keine Selektion, kein Genimport oder –export; autosomale Gene werden betrachtet).

Tab. 17: Charakteristika der untersuchten SNPs.

Gen	SNP Name	Synonym	Position	Frequenz (%)	Nukleotid-Austausch	Aminosäure Austausch
CETP	C-631A		Promotor	7.7	C/A	-
CETP	C-629A		Promotor	49.3	A/C	-
CETP	G+202/in1A		Intron 1	40.8	A/G	-
CETP	C+270/in1T		Intron 1	3.1	C/T	-
CETP	G+279/in1A		Intron 1	41.3	G/A	-
CETP	CETPu2	WIAF-10949	Exon 14	32.9	A/G	I -> V
LCAT	LCATu1	WIAF-10981	Exon 5	0	C/T	V
LCAT	LCATu3	WIAF-10983	Exon 6	4	C/T	L
LCAT	LCATu4	WIAF-11034	Exon 6	0	T/C	R
HL	C-448T		Promotor	1.2	C/T	-
HL	C-480T		Promotor	26	C/T	-
HL	LIPCu1	WIAF-11211	Exon 3	4.2	G/A	V -> M
HL	LIPCu3	WIAF-11213	Exon 4	44.3	T/G	V
HL	LIPCu5	WIAF-11214	Exon 5	8.1	A/G	G
HL	LIPCu6	WIAF-11215	Exon 5	37.6	A/G	N -> S
HL	LIPCu8	WIAF-11216	Exon 5	45.7	C/G	T
LPL	G-95T		Promotor	1.6	T/G	-
LPL	T-93G		Promotor	0.9	G/T	-
LPL	G188E		Exon 5	0	G/A	G -> E
LPL	N291S		Exon 6	2	A/G	N -> S
LPL	T+73/in6G		Intron 6	21.2	T/G	-
LPL	C+82/in6A		Intron 6	16.2	C/A	-
LPL	S447X		Exon 9	11	C/G	S -> X
LDLR	LDLRu5	WIAF-10989	Exon 10	43.5	G/A	R
LDLR	LDLRu1	WIAF-10994	Exon 13	41.2	T/C	V
LDLR	LDLRu12	WIAF-10996	Exon 15	26.4	G/A	R
APOE	C112R		Exon 3	15	T/C	C -> R
APOE	C158R		Exon 3	6.7	C/T	C -> R

In Abbildung 12 ist die Lokalisation der SNPs bezogen auf die genomische Karte von 4 der untersuchten Gene dargestellt.

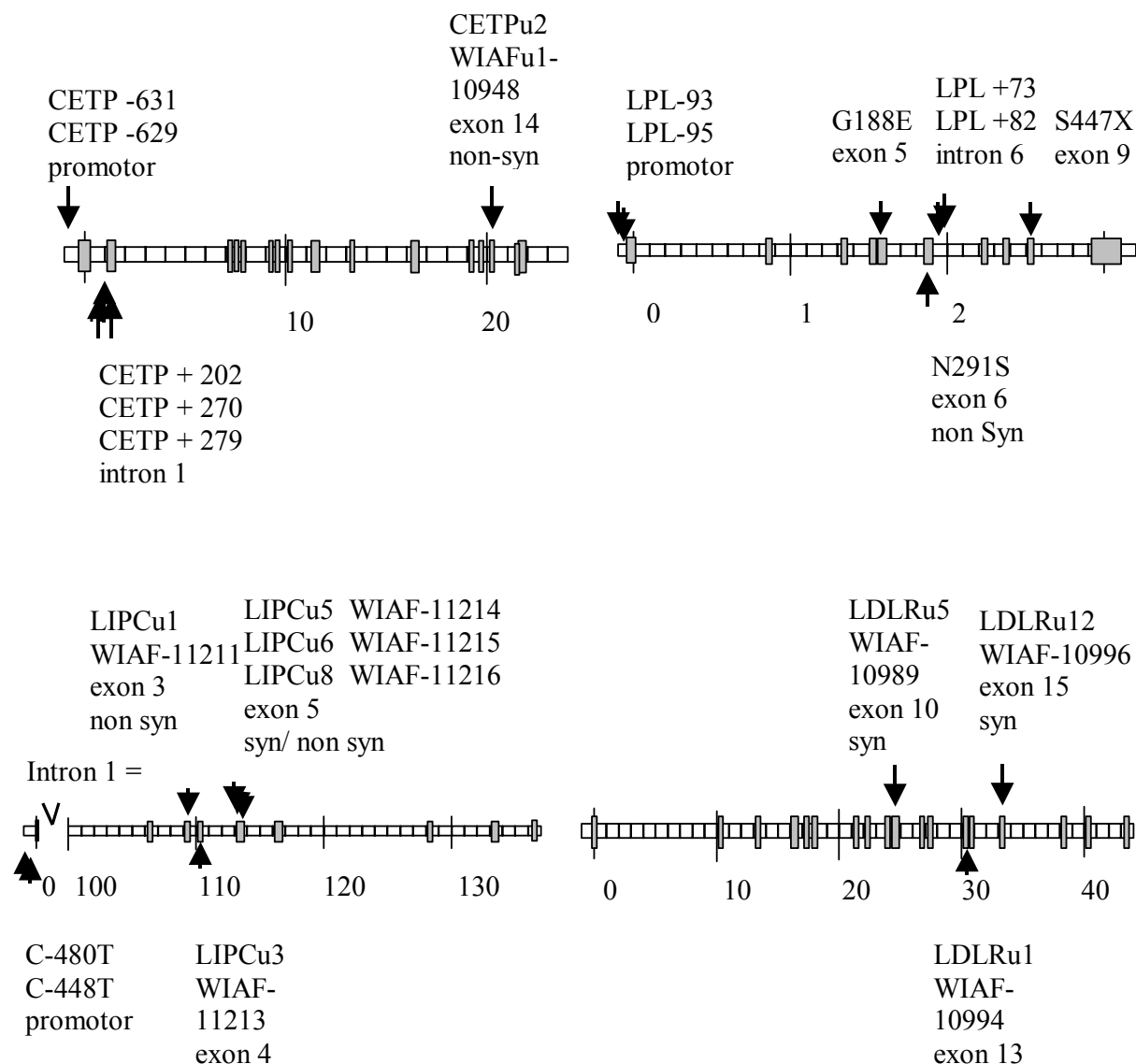


Abb. 12: Genomische Karte von vier Genen. Die grauen Kästchen entsprechen den Exons. Die nicht ausgefüllten Rechtecke entsprechen jeweils 1kb genomische DNA

SNPs im LCAT-Gen zeigten keine bzw. sehr geringe Variabilität. Aus diesen Gründen wurde das LCAT-Gen nicht dargestellt.

Die Anordnung von SNPs auf einem Chromosom wird als Haplotyp bezeichnet. Für die Berechnung der Haplotypen wurde das Programm von Fürst und Rohde eingesetzt (2001). Die Häufigkeit der Haplotypen in fünf der untersuchten Gene ist in Abbildung 13 dargestellt. Da das LCAT-Gen zu wenig Variabilität zeigte, wurden keine Haplotypen berechnet.

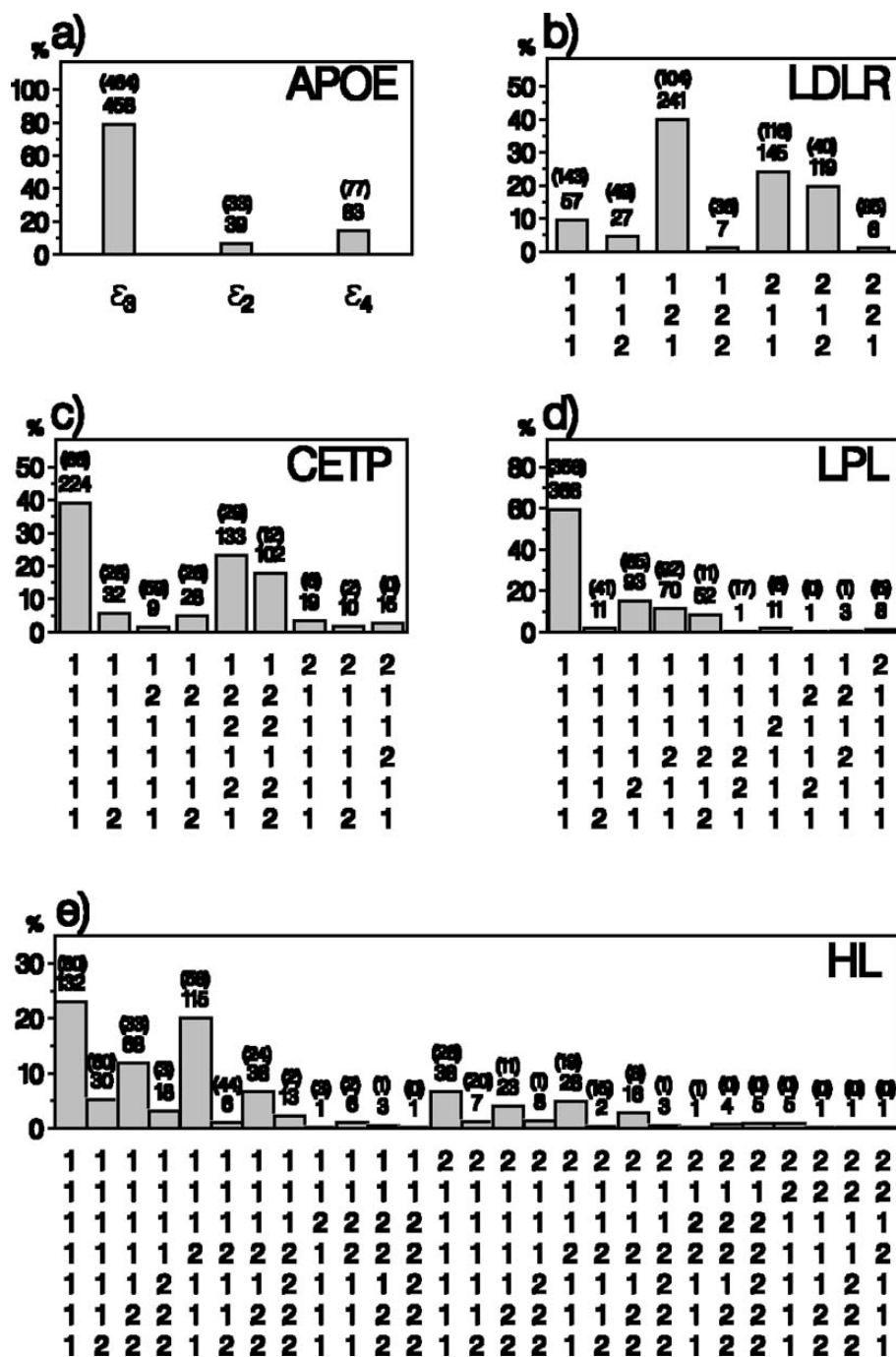


Abb. 13: Haplotyp-Frequenzen in einer Stichprobe unverwandter Personen. In Klammern sind die erwarteten Haplotyp-Frequenzen angegeben, darunter die beobachteten Frequenzen.

Die Darstellung der Haplotypen illustriert, daß die Anzahl der beobachteten Haplotypen geringer ist als die Zahl der zu erwarteten Haplotypen. Im CETP, in dem sechs SNPs genotypisiert wurden und somit 64 (2^6) Haplotypen theoretisch möglich sind, wurden nur neun Haplotypen beobachtet. Von den neun Haplotypen definieren lediglich fünf Haplotypen 91% der in der Bevölkerung vorkommenden Haplotypen. Im LPL-Gen wurden bei sechs in die Untersuchung einbezogenen SNPs lediglich zehn Haplotypen in dieser Stichprobe beobachtet. Vier der zehn Haplotypen beschreiben 94% der Haplotypen in der Bevölkerung. Im HL-Gen wurden 27 von 128 möglichen (2^7) Haplotypen beobachtet. Im LDLR-Gen wurden im Gegensatz dazu sieben von acht (2^3) möglichen Haplotypen beobachtet. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, daß mit einer geringen Anzahl von SNPs ein Großteil der Haplotyp-Diversität in der Bevölkerung beschrieben werden kann.

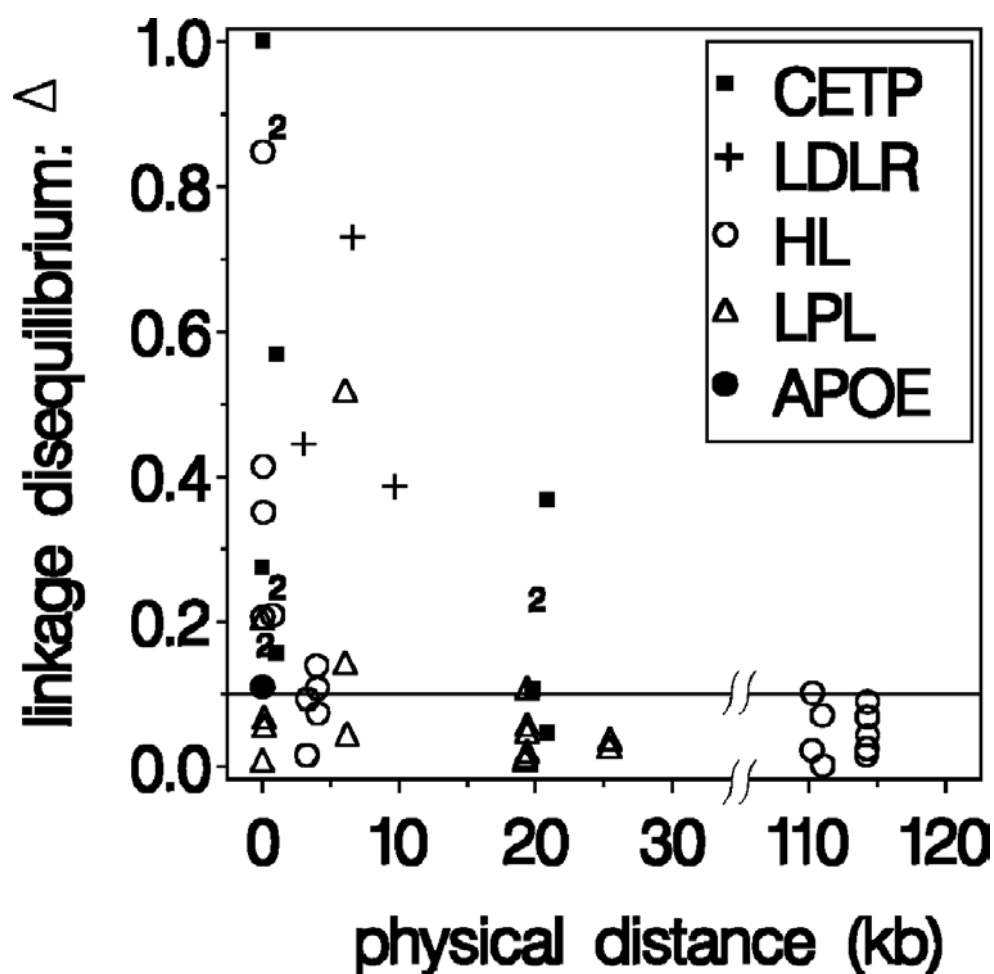


Abb. 14: Linkage Disequilibrium (berechnet als Pearson Korrelationskoeffizient Δ) als Funktion der genomischen Distanz in kb (Kilobasen).

Um den Beitrag der einzelnen Gene an der Variabilität der Lipidphänotypen zu ermitteln wurde zunächst untersucht, welchen Einfluß die Summe aller SNPs bzw. aller Haplotypen eines Genlokus auf die fünf gemessenen Lipidphänotypen hat. Für diese Analyse wurde ein Likelihood-Ratio-(LR)-Test durchgeführt, der anzeigt, ob sich ein signifikanter Unterschied in der Genotyp-Phänotyp-Analyse ergibt, in Abhängigkeit davon, ob die SNPs bzw. Haplotypen in die Analyse einbezogen wurden oder nicht. Für diese Analyse wurde die Varianzkomponenten-Analyse mit Hilfe des QTDT-Programms eingesetzt (<http://www.well.ox.ac.uk/asthma/QTDT>). In Tabelle 18 sind die Ergebnisse dieser Analyse dargestellt. Ein p-Wert zeigt an, daß ein Genort mit allen untersuchten SNPs bzw. Haplotypen einen signifikanten Einfluß auf den entsprechenden Phänotyp hat und somit einen Teil der Gesamtvarianz erklären kann. Die Analyse unter Einbeziehung der Haplotypen ergab stärker signifikante Ergebnisse als die Analyse mit den SNPs alleine. Das CETP-Gen beeinflusst die HDL-Cholesterin-Konzentration und den LDL/HDL-Quotienten; das LPL-Gen beeinflusst ebenfalls das HDL-Cholesterin. Das ApoE-Gen beeinflusst alle Lipidphänotypen. Weiterhin konnten signifikante Einflüsse einzelner Gene mit Hilfe der Haplotyp-basierten Analyse gezeigt werden, die in der SNP-basierten Analyse nicht gezeigt werden konnte. Das LDL-Rezeptor-Gen und das HL-Gen zeigen einen Einfluss auf die LDL-Cholesterin-Konzentration nur in der Haplotyp-basierten Analyse. Die Ergebnisse dieser Analysen lieferten erste Hinweise darauf, daß Haplotypen eher geeignet sind, um Genotyp-Phänotyp-Assoziationen zu beschreiben.

Tab. 18: Likelihood-Ratio Tests um den Einfluß eines Gens auf die Lipidphänotypen zu untersuchen. Der Test ist mit allen SNPs pro Gen bzw. mit allen Haplotypen pro Gen durchgeführt. p-Werte $< 0,5$ zeigen an, daß ein Phänotyp nicht unabhängig von den entsprechenden Genorten ist. Der LR-Test basiert auf einer Varianz-Komponenten Analyse mit den entsprechenden SNPs bzw. Haplotypen innerhalb der Gene als Co-Variate (volles Modell) bzw. ohne die entsprechenden SNPs bzw. Haplotypen innerhalb der Gene (Null Modell). In beide Modellen wurde die additive genetische Varianz und die Umweltvarianz einbezogen.

Gen	Phänotyp	SNPs LR-Test p-Wert	Haplotypen LR-Test p-Wert
CETP	TC		
	TGL		
	HDL	0.0498	0.0130
	LDL		
	LDL/HDL	0.016	0.0201
LPL	TC		
	TGL		
	HDL	0.0470	0.0280
	LDL		
	LDL/HDL		
LDLR	TC		0.0149
	TGL		
	HDL		
	LDL		0.0097
	LDL/HDL	0.049	0.025
Gen	Phänotyp	SNPs LR-Test p-Wert	Haplotypen LR-Test p-Wert
APOE	TC	0.0089	0.025
	TGL	0.027	
	HDL	0.0065	0.016
	LDL	0.0000	0.0000
	LDL/HDL	0.0000	0.0000
HL	TC		
	TGL		
	HDL		
	LDL		0.0071
	LDL/HDL	0.022	0.0011

Nachdem die Abhängigkeit eines Gens mit allen seinen Genotypen mit einem Lipidphänotyp gezeigt wurde, wurde als nächstes die Größe des Einflusses einzelner

Haplotypen mit den Lipidphänotypen ermittelt, unabhängig davon, ob der Einfluß eines einzelnen Haplotyps signifikant war oder nicht. Diese Strategie wurde gewählt, da in der vorherigen Analyse bereits der generelle Einfluss eines Gens gezeigt bzw. ausgeschlossen wurde und jetzt die Größe des Einflusses dargestellt werden sollte. Es wurden zwei verschiedene Muster beobachtet. Meistens, wie z.B. beim LDL-Rezeptor und dem LDL/HDL-Quotienten liegt, nachdem eine Normierung der Phänotypen durchgeführt wurde, der Mittelwert des häufigsten Haplotypen um 0. Die selteneren Haplotypen haben entweder einen erhöhenden oder einen erniedrigenden Effekt auf den Phänotyp. In anderen Fällen, wie z.B. dem CETP-Gen und HDL-Cholesterin ist der Mittelwert des normierten Phänotyps des häufigsten Haplotyps deutlich von 0 unterschiedlich, während die selteneren Haplotypen in die entgegengesetzte Richtung tendieren.

Tab. 19: Regressionsanalyse, um die Größe des Effekts einzelner Haplotypen darzustellen. Diese Analyse wurde nur bei den Genen durchgeführt, die einen signifikanten Effekt auf einen Lipidphänotyp gezeigt haben. Die Haplotypen wurden codiert als 0x, 1x oder 2x anwesend. Der Effekt ist als Regressionskoeffizient dargestellt und wurde mit Hilfe einer Varianz-Komponenten-Analyse unter einem biometrischen Modell ermittelt. Negative Werte zeigen einen erniedrigenden Effekt des Haplotypen, positive Werte einen erhöhenden Effekt an. Die Werte zeigen die Abweichung vom Populationsmittelwert an, ausgedrückt in Einheiten der Standardabweichung der log-transformierten Lipidphänotypen.

1 = signifikanter Effekt ($p < 0,05$) im Varianz-Komponenten-Analyse Modell.
 2 = signifikanter Effekt ($p < 0,05$) im nicht parametrischen Kruskal-Wallis-Test.
 3 = signifikanter Stratifikationseffekt ($p < 0,1$).

Haplotypen	0x	1x	2x	TC	TGL	HDL	LDL	LDL/HDL
APOE 11 (TC)	19	161	319	0.09	-0.15	-0.08	0.18 ¹	0.16 ²
APOE 12 (TT)	426	68	5	-0.33 ¹	0.28 ¹	0.34 ^{1,2}	-0.66 ^{1,2}	-0.68 ^{1,2}
APOE 21 (CC)	385	107	7	0.11	0.02	-0.13	0.21	0.25 ¹
CETP 111111 (CAACGA)	172	250	91			-0.26 ^{1,2}		0.25 ^{1,2}
CETP 111112 (CAACGG)	457	55	1			0.18 ³		-0.09 ³
CETP 121111 (CCACGA)	499	14	0			0.43 ²		-0.37 ²
CETP 121112 (CCACGG)	465	46	2			0.12		-0.15
CETP 122121 (CCGCAA)	313	180	20			0.20 ¹		-0.18 ¹
CETP 122122 (CCGCAG)	356	142	15			-0.01		-0.02
CETP 211111 (AAACGA)	478	35	0			0.16		0.04
CETP 211112 (AAACGG)	498	15	0			0.27		-0.46
CETP 211211 (AAATGA)	482	31	0			0.09		-0.22
LDLR 111 (GTG)	409	98	4	-0.32 ^{1,2}			-0.41 ^{1,2}	-0.40 ^{1,2,3}
LDLR 112 (GTA)	478	31	2	0.28			0.26	0.17
LDLR 121 (GCG)	190	229	92	0.08			0.08	0.05
LDLR 122 (GCA)	501	10	0	-0.11			0.01	-0.11
LDLR 211 (ATG)	294	192	25	0.11			0.07	0.03
LDLR 212 (ATA)	333	155	23	-0.15			-0.06	0.04
LDLR 221 (ACG)	496	15	0	0.30			0.29	0.34

LPL 111111 (TGATCC)	83	277	159	-0.04	
LPL 111112 (TGATCG)	500	18	1	-0.47 ²	
LPL 111121 (TGATAC)	368	144	7	0.23 ¹	
LPL 111211 (TGAGCC)	395	120	4	0.09	
LPL 111212 (TGAGCG)	431	84	4	-0.04 ³	
LPL 111221 (TGAGAC)	519	0	0	n.d.	
LPL 112111 (TGGTCC)	497	22	0	-0.33	
LPL 121121 (TTATAC)	519	0	0	n.d.	
LPL 121211 (TTAGCC)	509	10	0	-0.66	
LPL 211111 (GGATCC)	506	13	0	-0.29	
HL 111111 (CCGTAAC)	299	177	26	0.04	0.04
HL 111112 (CCGTAAG)	441	59	2	0.14	0.22
HL 111122 (CCGTAGG)	398	93	11	-0.10	-0.09
HL 111122 (CCGTGGG)	463	39	0	0.02	0.00
HL 111211 (CCGGAAC)	318	166	18	0.07	0.15
HL 111212 (CCGGAAG)	490	12	0	0.04	-0.21 ²
HL 111222 (CCGGAGG)	440	60	2	-0.11	-0.07
HL 111222 (CCGGGGG)	487	15	0	0.49 ²	0.37 ²
HL 112111 (CCATAAC)	500	2	0	-0.03	0.53
HL 112211 (CCAGAAC)	493	9	0	-0.46	-0.39
HL 112212 (CCAGAGG)	499	3	0	-0.05	0.37
HL 112222 (CCAGGGG)	500	2	0	0.29	0.66
HL 211111 (TCGTAAC)	429	70	3	0.42 ^{1,2}	0.38 ^{1,2}
HL 211112 (TCGTAAG)	484	18	0	-0.29	-0.42
HL 211122 (TCGTAGG)	465	36	1	-0.26	-0.29
HL 211122 (TCGTGGG)	492	10	0	-0.54	-0.56
HL 211211 (TCGGAAC)	455	45	2	-0.33 ¹	-0.30
HL 211212 (TCGGAAG)	498	4	0	0.05	-0.44
HL 211222 (TCGGAGG)	483	19	0	-0.13	-0.32
HL 211222 (TCGGGGG)	496	6	0	0.21	0.60
HL 212211 (TCAGAAC)	500	2	0	2.31 ¹	0.97
HL 212212 (TCAGAGG)	497	5	0	-0.13	-0.37
HL 212222 (TCAGGGG)	493	9	0	-0.04	-0.52
HL 221111 (TTGTAAC)	494	8	0	-0.47	-0.83 ¹
HL 221112 (TTGTAGG)	500	2	0	0.56	0.78
HL 221122 (TTGTGGG)	501	1	0	-1.01	-1.85
HL 221211 (TTGGAAC)	500	2	0	-2.10 ¹	-1.52 ¹

Als nächstes wurde der Effekt der Gesamtheit aller Genotypen auf die Gesamtvarianz bzw. die genetische Varianz der Lipidphänotypen analysiert. Es wurde der Anteil der durch die Genotypen determinierten genetischen Varianz an der Gesamtvarianz bzw. an der genetischen Varianz quantifiziert. Diese Analysen wurden wieder getrennt für die Gesamtheit aller Haplotypen (a) bzw. aller SNPs (b) durchgeführt.

Tabelle 20 zeigt, dass die Gesamtheit aller Genotypen einen signifikanten Einfluss auf LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin und den LDL/HDL-Quotienten hat. Wenn in die Analyse nur die Effekte aller Gene außer ApoE eingeschlossen werden, bleibt der Effekt, wenn auch schwächer, bestehen, mit Ausnahme des Einflusses der Gesamtheit der SNPs

auf das LDL-Cholesterin. Diese Analyse zeigt, daß ApoE-Genotypen zwar einen starken Einfluß auf die Phänotypen haben, die anderen Gene jedoch unabhängig von ApoE ebenfalls einen Effekt haben. Die Ergebnisse, die in Tabelle 18 dargestellt sind, werden somit bestätigt.

Mit Hilfe der Varianzkomponenten-Analyse wurde die Größe der Umweltvarianz (V_e) und der genetischen Varianz (V_g) bestimmt (Null-Modell). Die Umweltvarianz betrug ca. 56 und 71% der Gesamtvarianz für LDL und HDL. In einer zweiten Analyse wurde die Varianz, die durch die Genotypen determiniert ist (V_{reg}) mit berechnet (Volles Modell). Die Einbeziehung der Haplotypen bzw. SNPs in das Modell reduzierte die polygene Varianz deutlich. Da V_{reg} durch die Einbeziehung von SNPs bzw. Haplotypen, die keinen Effekt haben, künstlich vergrößert werden könnte, wurde ein Korrekturfaktor eingeführt.

Tab. 20: Assoziation der Gesamtheit aller SNPs bzw. Haplotypen mit den Lipidphänotypen (Spalte 3 und 4). Varianz-Komponenten als Anteile der Gesamtvarianz $V_{tot} = V_e + V_g + V_{reg} = 1.0$ ($V_{reg} = 0$ für das Null-Modell). Für jeden Phänotyp wurde ein volles Modell, daß alle Genotypen enthält mit einem Modell ohne diese Covariaten berechnet.

a) Haplotypen als genetische Einflußgrößen

Phänotyp	N	p (LR-Test)		Null-Modell		Volles Modell			V_{reg} adjusted
		Alle Gene	ohne ApoE	V_e	V_g	V_e	V_g residual	V_{reg}	
TC	443	0.08	0.2	0.66	0.34	0.66	0.19	0.15	0.06
TGL	441	No conv.	0.6	0.90	0.10	no conv.			
HDL	428	0.004	0.02	0.56	0.44	0.60	0.21	0.19	0.12
LDL	432	<0.0001	0.01	0.71	0.29	0.62	0.16	0.22	0.19
LDL/HDL	432	<0.0001	0.002	0.71	0.29	0.69	0.05	0.26	0.25

b) SNPs als genetische Einflußgrößen

Phänotyp	N	p (LR-Test)		Null-Modell		Volles Modell			V_{reg} adjusted
		Alle Gene	Ohne ApoE	V_e	V_g	V_e	V_g	V_{reg}	
TC	411	0.16	0.4	0.58	0.42	0.60	0.32	0.08	0.03
TGL	410	0.80	0.9	0.95	0.05	0.95	0.01	0.04	0.02
HDL	405	0.01	0.04	0.54	0.46	0.52	0.37	0.11	0.09
LDL	402	0.0007	0.1	0.66	0.34	0.65	0.22	0.13	0.12
LDL/HDL	400	<0.0001	0.04	0.66	0.34	0.64	0.20	0.16	0.15

Bemerkenswert ist der Effekt der Haplotypen auf den LDL/HDL-Quotienten. Die verbleibende genetische Varianz wurde für den LDL/HDL-Quotienten durch die Haplotypen auf 5% reduziert. Dies kann als ein Hinweis darauf verstanden werden, daß die genetischen Determinanten des LDL-C's und des HDL-C's unterschiedlich sind. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Daten aus früheren Zwillingsstudien (Knoblauch et al. 1997).

In Abbildung 15 ist in den letzten zwei Balken der Anteil der Gene dargestellt, der für LDL-C und HDL-C verschieden bzw. gemeinsam ist. Es wurde gezeigt, daß der Anteil gemeinsamer genetischer Einflußgrößen gering ist.

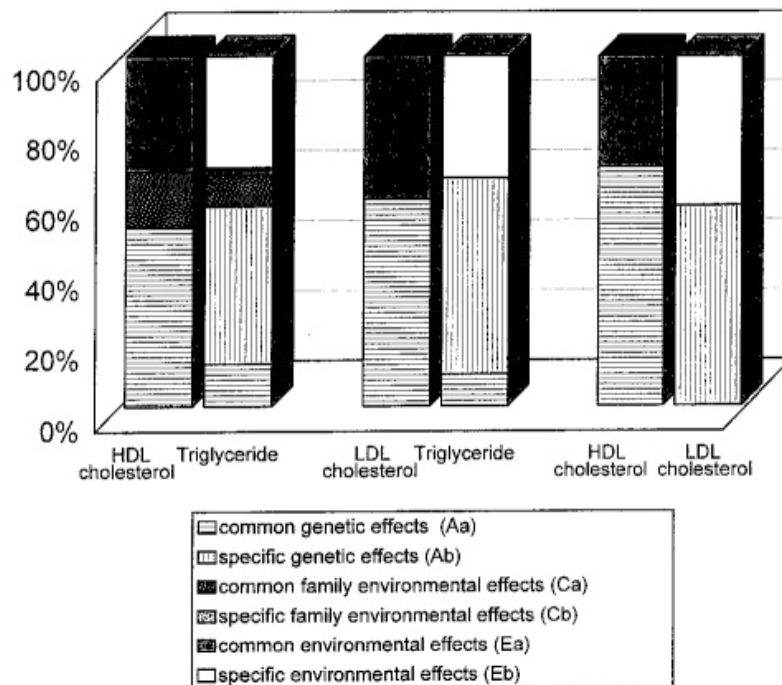


Abb. 15: Der Anteil gemeinsamer bzw. unterschiedlicher genetischer, familiärer und umweltbedingter Faktoren in Zwillingen (Knoblauch et al., 1997).

Knoblauch H, Bauerfeind A, Krähenbühl C, Daury A, Rohde K, Bejanin S, Essioux L, Schuster H, Luft FC, and Reich J (2002) Common haplotypes in five genes explain forty percent of the genetic variance on LDL and HDL cholesterol in the general population Hum Mol Genet, in press.

2.5 Theoretische Modellierung des Lipidstoffwechsels

Um der Komplexität eines Stoffwechselsystems näher zu kommen sind sowohl experimentelle als auch theoretische Ansätze notwendig (Cornish-Bowden, 1999). Im folgenden wird der theoretische Ansatz der mathematischen Modellierung des Lipidstoffwechsels vorgestellt.

Die Grundidee der Modellierung des Lipidstoffwechsels basiert auf der Annahme einer bestimmten Anzahl von Metaboliten, die durch Enzyme, Transferproteine und Rezeptoren miteinander in Verbindung stehen. Die Metaboliten sind die Lipoproteinpartikel VLDL (very low density Lipoprotein Partikel), LDL (low density Lipoprotein Partikel), IDL (intermediate density Lipoprotein Partikel), HDL-Vorläufer (naszierendes HDL und diskoides HDL), HDL (HDL₂ und HDL₃), Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants. Die Reaktionen zwischen den Metaboliten werden durch stöchiometrische Umsatzgleichungen definiert. Die Umsatzraten können durch Aktivatoren und Inhibitoren reguliert werden. Die Aktivität der Enzyme, Rezeptoren und Transportproteine, die an diesen Reaktionen teilnehmen, sind wiederum abhängig von den allelischen Varianten des für das Protein kodierenden Gens. Die Summe aller möglichen Allelkombinationen (Allelotypen) erklärt in ihrer Gesamtheit den genetischen Anteil der phänotypischen Varianz als Funktion der genotypischen Varianz. Das entwickelte Modell sollte einerseits der Komplexität des Lipidstoffwechsels gerecht werden, andererseits eine vereinfachte aber möglichst realitätsnahe Abbildung des Lipidstoffwechsels darstellen.

Bei einem mathematischen Modell wird die Beschreibung der Beziehungen der im Modell enthaltenen Größen durch eine möglichst systemanaloge Gestaltung des Systems durch Bilanzgleichungen und ihrer Parameter angestrebt. Die Qualität einer solchen Modellierung kann anhand von folgenden Kriterien beurteilt werden:

- Das Modell beschreibt die Konzentration der Metaboliten in zahlreichen Stoffwechselzuständen qualitativ oder quantitativ korrekt.
- Das Modell beschreibt die Wirkung von "Stoffwechseldefekten" zutreffend. Hierbei wird ein Stoffwechseldefekt simuliert, indem man die Aktivität des zugehörigen Genprodukts auf einen niedrigen Wert einstellt. Dann sollte eine korrekte Beschreibung der klinisch beobachteten Fluß- und Konzentrationsänderungen vorhergesagt werden (z.B. sollte bei einem Funktionsverlust des LDL-Rezeptors das LDL ansteigen).

Einschränkend ist zu bemerken, daß ein mathematisches Modell niemals eindeutig sein wird. Die große Anzahl von Parametern (jede Reaktion kann bis zu zehn kinetische Parameter haben) ist nicht vollständig meßbar. Ein befriedigendes Modell wird jedoch auch dann entstehen, wenn nicht alle Parameter genau bestimmt wurden, sondern nur ihre Größenordnung stimmt. Ein zutreffendes Modell wird jedoch die prinzipiellen dynamischen Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Größen korrekt wiedergeben. Aus der Theorie des Zellstoffwechsels ist bekannt, daß die prinzipiellen dynamischen Abhängigkeiten durch die stöchiometrischen Beziehungen festgelegt werden (Heinrich et al., 1996; Reich et al., 1981). Jede Phänotyp-Variable (z.B. VLVL, LDL, HDL₂) bewegt sich nach einer gewöhnlichen Differentialgleichung. Die momentane Zu- oder Abnahme-Tendenz der Stoffwechselgröße ergibt sich aus der Summe aller Reaktionsgeschwindigkeiten, die diesen Metaboliten herstellen minus der Summe aller Reaktionsgeschwindigkeiten, die diesen Metaboliten verbrauchen (Bilanz-Gleichungen). Im stationären Zustand, von dem angenommen wird, daß er sich nach kurzer Zeit einstellt, bewegt sich die Metabolitkonzentration nicht mehr, so daß ein System von Bilanzgleichungen erfüllt ist: die Summe aller herstellenden Reaktionen ist gleich der Summe aller verbrauchenden Reaktionen.

$$\begin{aligned}
 \text{CHYL (Chylomicronen)} &= v_1 - v_{4a} - v_{13} \\
 \text{VLDL} &= v_2 - v_{4b} - v_{14} \\
 \text{DISC (diskoides HDL)} &= (v_3 + v_{4a} + v_{4b}) - v_5 - v_{15} \\
 \text{LDL} &= v_{7b} + v_{7c} - v_{11} - v_{16} \\
 \text{HDL3} &= v_5 - v_{6a} - v_{6b} + v_{7a} + v_{7b} - v_{17} \\
 \text{HDL2} &= v_{6a} + v_{6b} - v_{7a} - v_{7b} - v_{18} \\
 \text{IDL} &= v_{4b} - v_{7b} - v_{7c} - v_9 - v_{10} \\
 \text{Chylomicron remnants} &= v_{4a} - v_8 - v_{12}.
 \end{aligned}$$

Wenn die Summe dieser Gleichungen in einem bestimmten Zeitraum Null ist, ist ein Gleichgewichtszustand erreicht, in dem die Konzentration der Metabolite konstant ist. Man muß dann durch eine Perturbationsrechnung prüfen, ob dieser stationäre Zustand auch gegen kleine Abweichungen stabil ist. V ist eine nicht-lineare Funktion der Rate, in Abhängigkeit von:

- den Metabolitkonzentrationen, die als Substrat fungieren (meist positiver Einfluß)
- den Metabolitkonzentrationen, die als Produkt fungieren (meist hemmender Einfluß)
- den Metabolitkonzentrationen, die die Aktivität modulieren (aktivieren, hemmen), ohne selbst umgesetzt zu werden
- Affinitätsparametern
- Hemmparametern
- Äußeren Parametern (z.B. dem Angebot an Triglyzeriden im Darm)
- der Konzentration an Genprodukten (z.B. Enzyme, Rezeptoren, Transportproteine)

Die allgemeine Formulierung der Rategleichung lautet:

$$Rate = \frac{V_{\max}}{\Delta} \times f(\text{substrateterms})$$

Δ beschreibt die Besetzung eines Proteins, z.B. eines Enzyms, durch die an der Reaktion beteiligten Metabolite.

Die genetische Variabilität kann auf folgende Weise in das Modell integriert werden: Die Genprodukt-Konzentration hängt u.a. vom Allelotyp (der Kombination verschiedener Allele an unterschiedlichen Loci) der betreffenden Person ab. Sie mag Allele haben, die eine hohe Konzentration, oder solche, die eine niedrige Konzentration des Genprodukts erzeugen (z.B. können Varianten des LDL-Rezeptor-Gens individuell eine höhere oder niedrigere Aktivität dieses Rezeptors bewirken, entweder weil die Anzahl an Rezeptoren verschieden ist oder weil die Funktion des Rezeptors, Bindungsstärke usw., verändert ist). Dieser Einfluß des Allelotyps auf einen wichtigen Parameter der zugehörigen Stoffwechselreaktion im Stoffwechselnetz modelliert die Wirkung des Genotyps auf den Phänotyp (Knoblauch et al., 2000), wenn auch oft nicht mit völliger quantitativer Präzision.

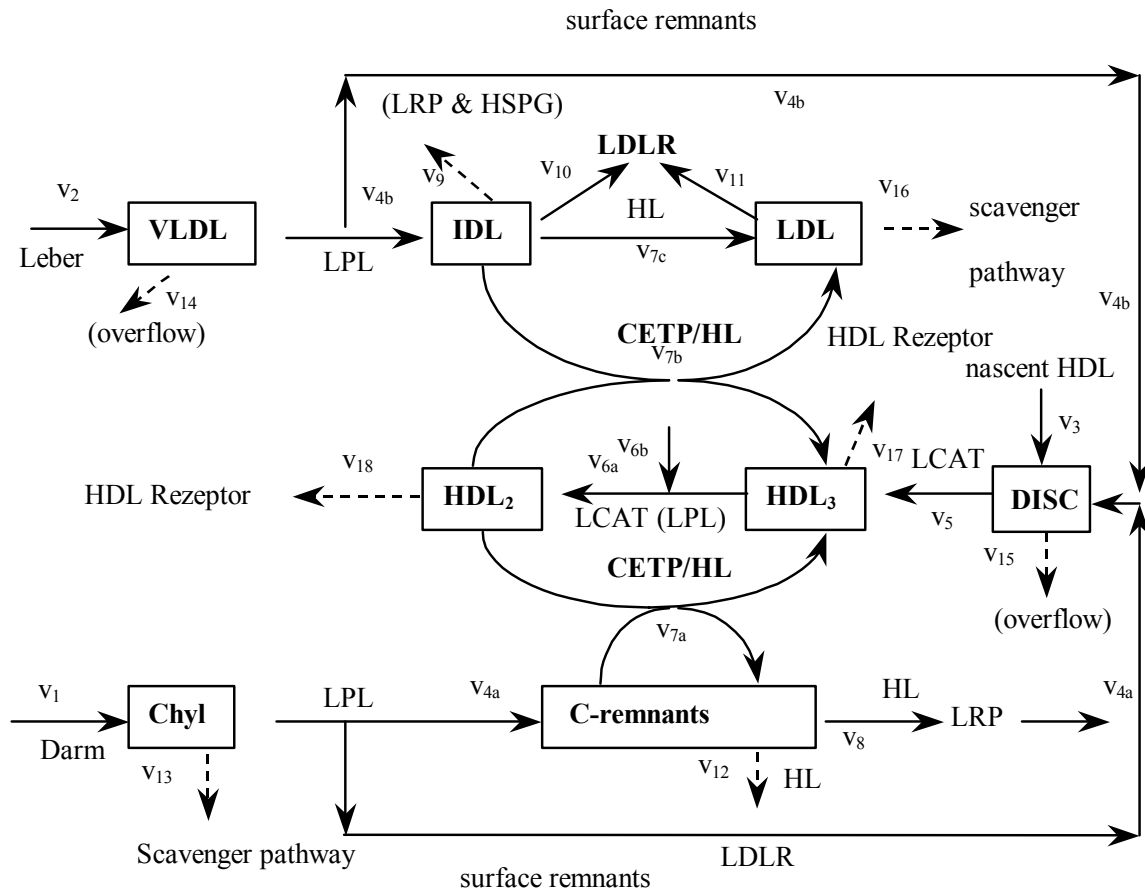


Abb. 16: Mathematisches Modell des Lipidstoffwechsels (Knoblauch et al., 2000).

Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der mathematischen Modellierung eines Teils des Lipidstoffwechsels, der in den Blutgefäßen stattfindet. Der *exogene* Teil des Lipidstoffwechsels ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt und beginnt mit der Aufnahme von Nahrungsfetten im Darm, die im Darmepithel als Chylomikronen verpackt in das Lymphgefäß- und anschließend in das venöse Blutsystem gelangen. In der Leber und den Kapillaren, insbesondere des Fett- und Muskelgewebes werden die in diesen Partikeln enthaltenen Triglyzeride von der Lipoprotein-Lipase hydrolysiert. Die entstandenen Fettsäuren werden von den entsprechenden Zellen aufgenommen. Die verbleibenden Partikel werden als Chylomikronen-Remnants (CR) bezeichnet und durch das LRP (LDL-Rezeptor related Protein) in der Leber aufgenommen. Der *endogene* Stoffwechselweg beginnt mit der Synthese von VLDL-Partikeln in der Leber. Auch diese Partikel werden in den peripheren Zellen des Fett- und Muskelgewebes von der Lipoprotein-Lipase hydrolysiert. Die entstandenen Partikel werden IDL-Partikel genannt. IDL-Partikel werden durch CETP und die Hepatische Lipase (HL) in LDL-Partikel

umgewandelt. LDL-Partikel werden über den LDL-Rezeptor oder einen Scavenger-Pathway in die Zellen aufgenommen. HDL-Partikel entstehen über mehrere Vorläuferpartikel durch die Hinzufügung von *Surface Remnants*. Die *Surface Remnants* sind das Produkt der Hydrolyse von VLDL-Partikeln und Chylomikronen durch die LPL. Das Enzym LCAT konvertiert die diskoiden HDL-Vorläufer in HDL3-Partikel, die durch weitere Umwandlungen in HDL2 überführt werden. HDL2 kann mit Hilfe von CETP und HL wieder in HDL3 überführt werden, so daß ein Kreislauf entsteht, bei dem Cholesterinester von HDL-Partikeln auf Partikel des endogenen Lipidstoffwechsels übertragen werden. Aus diesem Grund wird der HDL-Stoffwechselweg auch *Reverse Cholesterol Pathway* genannt. Die drei Teile des Lipidstoffwechsels, der exogene, endogene und der *reverse pathway*, sind über eine Reihe von gekoppelten Reaktionen stark miteinander verbunden, die in der Abbildung 16 durch Pfeile gekennzeichnet sind. Ziel der Modellierung des Lipidstoffwechsels war, die Effekte der Kopplungen der unterschiedlichen Teile des Systems besser beschreiben zu können.

Auf der Basis des Modells wurden Defekte einzelner Komponenten des Lipidstoffwechsels simuliert und überprüft, inwiefern die Konzentrationen von Lipoproteinpartikeln, die das Modell vorhersagt, mit den Konzentrationen übereinstimmen, die bei Patienten mit genetischen Defekten in den entsprechenden Genen beobachtet werden. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse dieser Simulationen am Beispiel des LDL-Rezeptors und der Lipoprotein Lipase.

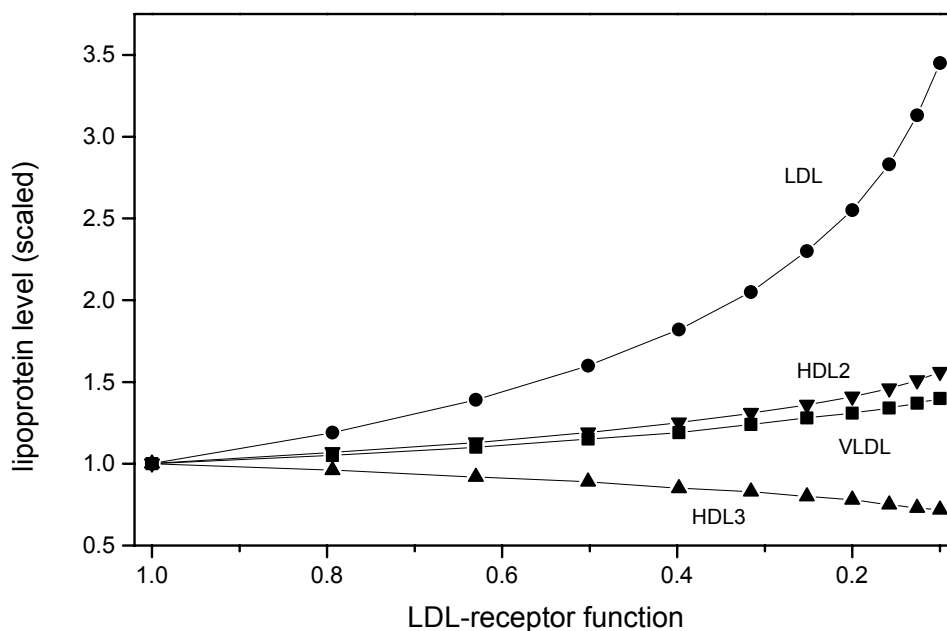


Abb. 17: Eine Reduktion der Funktion des LDL-Rezeptors von 1 (volle Funktion) auf 0,1 (10% Restaktivität) innerhalb des Modells zeigt Vorhersagen der Lipoprotein-Konzentrationen, die denen von Patienten mit einer Familiären Hypercholesterinämie durch Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen ähnlich sind.

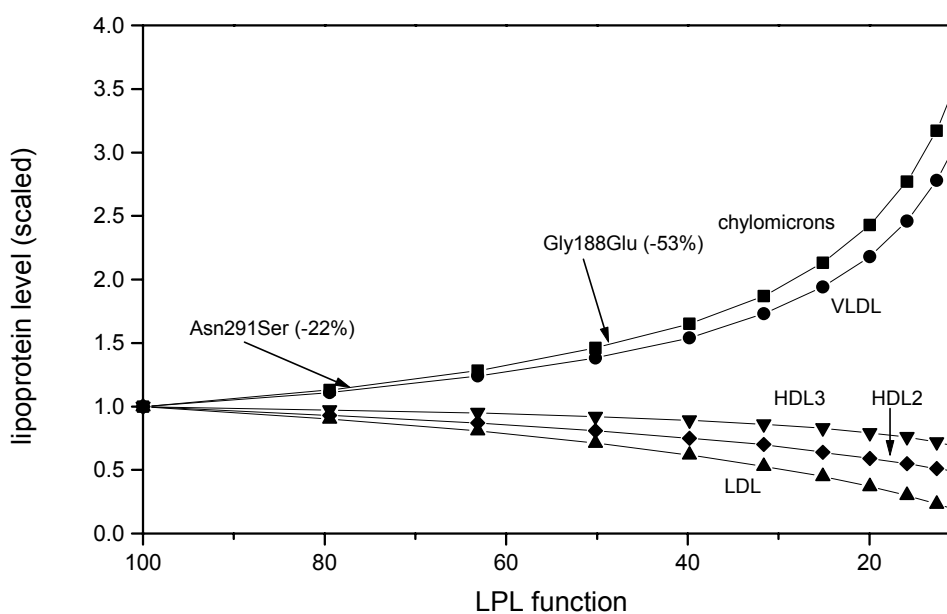


Abb. 18: Eine Reduktion der Funktion der Lipoprotein Lipase von 100 auf 10% Restaktivität innerhalb des Modells zeigt Vorhersagen der Lipoprotein-Konzentrationen, die denen von Patienten mit definierten Varianten im LPL-Gen ähnlich sind. Als Beispiel sind zwei Mutationen im LPL-Gen (Asn291Ser und Gly188Glu) dargestellt, von denen bekannt ist, zu welchem prozentualen Funktionsverlust sie führen.

Das Modell erlaubt weiterhin die Simulation des Verhaltens des Lipidstoffwechsels, wenn das System durch die Zufuhr von exogenen Lipiden belastet wird und gleichzeitig definierte genetische Varianten vorliegen. Die Ergebnisse dieser Simulationen sind in Abbildung 19 dargestellt.

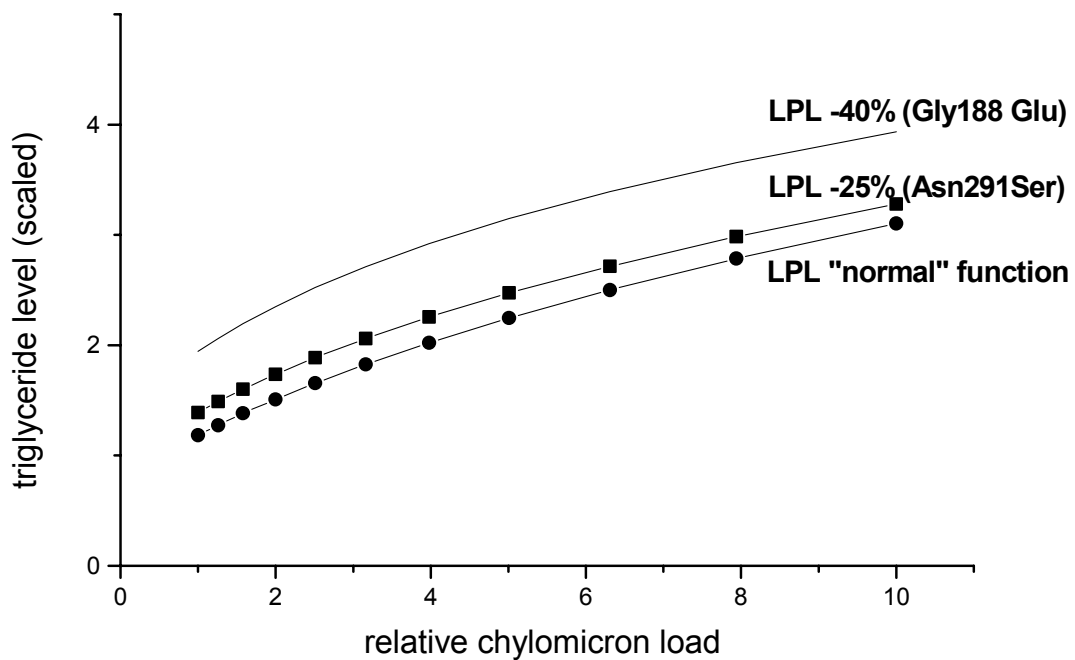


Abb. 19: zeigt, dass Personen mit einem 40%-igen bzw. 25%-igen Funktionsverlust der LPL bei gleicher Chylomikronen-Belastung mit höheren Triglyzerid-Werten reagieren, als Personen mit einer „normal“ funktionierenden LPL.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

Knoblauch H, Schuster H, Luft FC, Reich J. *A pathway model of lipid metabolism to predict the effect of genetic variability on lipid levels.* *J Mol Med.* 2000; 78:507-15.

3 DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, welche genetischen Faktoren den Lipidstoffwechsel beeinflussen und mit welchen Strategien diese genetischen Einflußfaktoren auf komplexe Phänotypen (am Beispiel des Lipidstoffwechsels) untersucht werden können. Vier der beschriebenen verschiedenen Strategien werden numehr diskutiert. Diese Strategien stellen jedoch nur einen Teil der möglichen Herangehensweisen an das Phänomen der komplexen Phänotypen (Darvasi und Pisante-Shalom, 2002) und der Analyse genetischer Einflussfaktoren auf quantitative Merkmale dar (Ober et al., 2001; Williams et al., 2001; Yi und Su, 2002).

Modifizierende Gene bei Patienten mit familiären Hyperlipidämien

Monogene Erkrankungen können eine wesentliche Rolle für das Verständnis komplexer polygener Erkrankungen innerhalb des gleichen pathophysiologischen Zusammenhangs liefern (Fritzky et al., 1999; Luft, 1995; Nadeau, 2001). Umgekehrt tragen Erkenntnisse aus Biochemie und Pathophysiologie zur Identifizierung möglicher Kandidatengene komplexer Phänotypen bei (Beisiegel, 2002). Für die Identifizierung modifizierender Gene eignen sich Familien mit monogenen Erkrankungen besonders gut, da bei den betroffenen Familienmitgliedern eine identische molekulargenetisch definierte Veränderung vorliegt und die Variabilität eines Merkmals vor diesem Hintergrund besonders deutlich wird. Allerdings wird in letzter Zeit zunehmend deutlich, dass auch monogen bedingte Erkrankungen durch Umweltfaktoren wesentlich beeinflusst werden können (Hegele, 2002) und häufig Merkmale komplexer Phänotypen aufweisen (Dipple und McCabe, 2000; Scriver und Waters, 1999). Zum Beispiel können Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie aus Ländern wie China oder Tunesien, in denen eine fettärmere Kost verzehrt wird, niedrigere LDL-Cholesterin-Konzentrationen haben, als Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie aus Ländern in denen eine fettreichere Nahrung verzehrt wird (Sun et al. 1994; Slimane et al. 1993). Wenn die Umweltbedingungen, die einen Einfluß auf das Merkmal haben, die beobachtete Variabilität nicht erklären können, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass modifizierende genetische Faktoren einen Einfluß haben.

Am Beispiel von zwei Familien mit einer familiären Hypercholesterinämie und mit einer definierten Veränderung im LDLR-Gen wurde die Variabilität der Xanthomgröße

(Vergopoulos et al., 1997) und die Variabilität der LDL-C-Konzentration (Knoblauch et al., 2000) untersucht. Exemplarisch soll an dieser Stelle der Fall einer großen arabischen Familie diskutiert werden, in der ein Cholesterin-senkender Genort auf Chromosom 13q kartiert werden konnte. Ein Cholesterin-senkendes Gen wurde bereits 1989 von Hobbs et al. in einer Familie aus Puerto Rico vermutet. Die Nahrungszusammensetzung der im Rahmen dieser Arbeiten untersuchten Arabischen Familie unterscheidet sich nicht von der Ernährung der im benachbarten Libanon lebenden christlich-arabischen Bevölkerung mit Familiärer Hypercholesterinämie, die ursprünglich von Khachadurian (1964) beschrieben wurde und die eine Mutation haben, die funktionell ähnliche Wirkungen hat, wie die in der von uns untersuchten Familie, so dass ernährungsbedingte Ursachen keine Erklärung für den beobachteten Effekt lieferten.

Die Methoden der Genom-weiten Kopplungsanalysen erlauben eine Kartierung dieser modifizierenden genetischen Faktoren, wenn eine ausreichende Stichprobengröße vorhanden ist (Ott, 1991). In diesem Fall war die untersuchte Familie groß genug, so dass ein Genort auf dem langen Arm von Chromosom 13 identifiziert werden konnte, der ein modifizierendes Gen für den LDL-C-Stoffwechsel enthält. Die Identifizierung des Cholesterin-senkenden Gens selbst ist zur Zeit unter Bearbeitung, da der Bereich auf Chromosom 13 mehr als 30cM beträgt und in dieser Region keine offensichtlichen Kandidatengene liegen. Auch durch das Studium syntener Regionen der Maus konnten keine weiteren Anhaltspunkte für mögliche Kandidatengene gefunden werden (Welch et al., 1996).

Die Identifizierung eines Cholesterin-senkenden Gens und eines Gens, das an der Pathogenese der Xanthombildung beteiligt ist, könnte einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Interventionspunkte für die Therapie von Hyperlipidämien bzw. der Arteriosklerose bieten.

Zwillingsuntersuchungen innerhalb des Lipidstoffwechsel

Nachdem ein modifizierender genetischer Faktor, z.B. eine chromosomale Region, in der eine Kopplung zu einem Merkmal besteht, gefunden wurde, stellt sich die Frage, welche Relevanz dieser Faktor außerhalb der seltenen Familien mit monogenen Erkrankungen hat, in denen er nachgewiesen wurde (Luft, 1995). Für diese Fragestellung eignen sich *Quantitative-Trait-Lokus-Analysen* (QTL). QTL-Analysen untersuchen den Einfluss eines Genorts bzw. einer genetischen Variante auf ein quantitatives Merkmal (Paterson, 1995).

So konnte z.B. mit Hilfe von QTL-Analysen der Einfluss von Varianten des Lipoprotein(a) Gens auf die Gesamtvariabilität der Lp(a)-Konzentration ermittelt werden (Scholz et al., 1999). Eine erste Annäherung an den Anteil der Varianz, der durch genetische Faktoren bedingt ist, ist mit Hilfe von Zwillingsanalysen möglich (Austin et al. 1992). Zwillinge bieten die Möglichkeit, die Heritabilität (den Anteil der genetischen Varianz an der Gesamtvarianz eines Merkmals) zu berechnen und somit die Größe des Einflusses genetischer Faktoren zu quantifizieren. Weiterhin eignen sich die dizygoten Zwillinge, um Geschwisterpaar-Analysen durchzuführen (Martin et al., 1997). Dizygote Zwillinge bieten gegenüber Geschwistern, die keine Zwillinge sind, einige Vorteile, z.B. das gleiche Alter und die gemeinsame intrauterine Umwelt, so dass sie eine größere *Power* für statistische Analysen quantitativer Merkmale haben (Martin et al., 1997).

Mit Hilfe der Zwillingsanalysen konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, dass die Heritabilität der Lipidwerte in einer Stichprobe junger gesunder Zwillinge aus Deutschland bei ca. 50% liegt. Diese Daten stimmen mit anderen Studien überein, die die Heritabilität der Lipide untersucht haben (Marenberg et al., 1994). Eine Ausnahme stellt die Heritabilität der Lipoprotein(a)-Konzentration dar, die zu einem wesentlich höheren Anteil genetisch bedingt ist und zum größten Teil durch unterschiedliche Variationen innerhalb des Lipoprotein(a) Gens bedingt ist. Interessanterweise besteht ein Unterschied in der genetischen Architektur des Lipoprotein(a)-Gens und seines Einflusses auf die Lipoprotein(a)-Konzentration zwischen unterschiedlichen Bevölkerungen, z.B. zwischen Kaukasiern und Afrikanern (Utermann, 1999). Diese ethnischen Unterschiede der genetischen Architektur müssen somit bei der Betrachtung komplexer Phänotypen mit berücksichtigt werden.

Mit Hilfe von QTL-Analysen bei Zwillingen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Cholesterin-senkende Genort auf Chromosom 13q auch die Variabilität der Lipidphänotypen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zwillingsstichprobe beeinflusst (Knoblauch et al., 2000). Diese Analysen zeigen, dass ein Genort, der in einer Familie aus Israel einen modifizierenden Einfluss auf die LDL-Cholesterinkonzentrationen hat, auch in einer deutschen Stichprobe gesunder junger Zwillinge einen Einfluss haben kann. Obwohl die genetischen Varianten innerhalb des Cholesterin-senkenden Gens noch nicht identifiziert werden konnten, liegt auch hier die Vermutung nahe, dass andere Veränderungen ursächlich sind, als in der arabischen Familie. Mit Hilfe eines ähnlichen Ansatzes konnten Austin et al. (1998) den Einfluss unterschiedlicher Gene

des Lipidstoffwechsels auf assoziierte Phänotypen zeigen. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Genorte mit der Variabilität der Lipidphänotypen im physiologischen Bereich gekoppelt werden (Knoblauch et al., 1997, 1999).

Familienbasierte Assoziationsstudien an einer Bevölkerungsstichprobe

Als nächster Schritt in Richtung der Identifizierung der genetischen Einflussgrößen auf den Lipidstoffwechsel wurde untersucht, welche genetischen Varianten innerhalb welcher Gene einen Effekt auf die Variabilität des Lipidstoffwechsels haben. Da im Rahmen dieser Arbeit häufige Varianten identifiziert werden sollten, die einen Einfluss ausserhalb von Familien mit seltenen monogenen Erkrankungen haben und die möglichst die Variabilität innerhalb einer bevölkerungsrepräsentativen Kohorte widerspiegeln sollte, wurden als weitere Annäherung an solch eine bevölkerungsrepräsentative Stichprobe 184 Familien ausgewählt, deren Lipidwertverteilungen mit den Daten großer epidemiologischer Kohorten, wie z.B. der Framingham- (Kannel et al., 1971) oder der PROCAM-Studie (Jaross, 1994), übereinstimmen. Zu diesem Zweck wurden Gene ausgewählt, von denen aufgrund biochemischer und physiologischer Untersuchungsergebnisse bekannt war, dass sie wichtige Funktionen innerhalb des Lipidstoffwechsels haben (Heeren und Beisiegel, 2001; Schiele et al., 2000; Scriver, 1995). Diese Untersuchung zeigte, daß es möglich ist, genetische Faktoren, bestehend aus SNPs und Haplotypen zu identifizieren, die einen Einfluß auf Lipidphänotypen im physiologischen Bereich haben. Besonders aussagekräftig ist in diesem Zusammenhang die Kombination von SNPs auf einem Chromosom als Haplotyp. Mit einer geringen Anzahl von SNPs konnte ein Großteil der Haplotypvariabilität in der Bevölkerung beschrieben werden. Diese Aussage stimmt mit anderen Studien, die Haplotypen in unterschiedlichen Bevölkerungsstichproben untersucht haben überein (Reich et al., 2001; Abecasis et al., 2001; Dunning et al., 2000; Taillon-Miller et al., 2000). Die Ursache für das Vorkommen von nur einigen wenigen Haplotypen in den untersuchten Genen innerhalb der Bevölkerung ist u.a. durch das Phänomen des Linkage Disequilibrium zu erklären (Pritchard et al., 2001). Linkage Disequilibrium beschreibt die Tatsache, dass genomisch benachbarte SNPs signifikant häufiger zusammen auf einem Chromosom lokalisiert sind, als weiter entfernt lokalisierte SNPs, die durch Rekombinationsereignisse voneinander getrennt wurden. Die Struktur des Linkage Disequilibriums ist abhängig von vielen Faktoren, u.a. der demographischen Geschichte einer Bevölkerung, der Mutations- und der Rekombinationsrate (Weiss et al., 2002). Von

entscheidender Bedeutung für die Entstehung der Linkage Disequilibrium Struktur sind insbesondere Bevölkungsengpässe (bottlenecks), die dazu geführt haben, dass nur die Haplotypen einiger weniger Individuen erhalten geblieben sind, die sich dann in einer exponentiell wachsenden Bevölkerung durchgesetzt haben (Pritchard et al., 2001).

Mit Hilfe des gewählten Familienbasierten Studiendesigns war es nicht nur möglich, die Haplotypen zuverlässiger zu konstruieren, als es mit nicht verwandten Personen möglich gewesen wäre (Dawson et al., 2002), sondern es konnte weiterhin die Methode der familienbasierten Varianzkomponenten-Analyse eingesetzt werden. Diese Methode erlaubt die Aufteilung der Gesamtvarianz eines Phänotyps in seine unterschiedlichen Varianzanteile (Sham et al., 2000). Die Varianz, die Umwelteinflüssen zugeschrieben werden konnte, betrug zwischen 60 und 69% und lag damit etwas über den Daten, die mit Hilfe von Zwillingsuntersuchungen erhoben wurden (Marenberg et al., 1984; Knoblauch et al., 1997). Ursächlich für diese größere Umweltvarianz in der hier vorgestellten Arbeit könnte die größere Heterogenität der untersuchten Bevölkerung und die größere Variabilität der im Labor eingesetzten Techniken sein. Die genetische Varianz, die durch die in die Analyse einbezogenen Gene erklärt werden konnte, betrug ca. 20% der Gesamtvariabilität von LDL- und HDL-Cholesterin. Durch die Kombination von LDL-C und HDL-C zum LDL/HDL-Quotienten konnte sogar ein deutlich größerer Anteil der genetischen Varianz erklärt werden. Erklärt werden kann diese Beobachtung durch die Hypothese, dass die genetischen Einflussgrößen für LDL-C und HDL-C unterschiedlich sind. Bestätigt wird diese Hypothese durch Zwillingsstudien, die bereits einen Hinweis lieferten, dass die genetischen Determinanten von LDL-C und HDL-C in der Tat unterschiedlich sind (Knoblauch et al., 1997). Dies ist insofern von Bedeutung, als der LDL/HDL-Quotient ein wichtiger und klinisch häufig eingesetzter Parameter für die Ermittlung des Herz-Kreislauf-Risikos ist (Ridker et al., 2001). Als Referenz für den Nachweis eines genetischen Einflusses diente das ApoE-Gen, das einen bekannten deutlichen Einfluss auf die Lipidkonzentrationen hat (Hagberg et al., 2000; Schiele et al., 2000; Utermann, 1988), der auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Unabhängig vom Einfluss des ApoE-Gens konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die anderen untersuchten Gene, z.B. das LDL-Rezeptor-Gen, das CETP-Gen und das LPL-Gen einen signifikanten Einfluss haben.

Als weiteres Ergebnis dieser Analyse wurde die *common disease – common variant* Hypothese bestätigt, die besagt, daß häufige Merkmale nur durch häufige genetische Varianten erklärt werden können (Collins et al., 1997). Diese Hypothese wird im Gegensatz zu der Annahme einer großen Zahl seltener Varianten diskutiert (Pritchard und Przeworski, 2001).

Die Einbeziehung weiterer Gene und ihrer Varianten in die Genotyp-Phänotyp-Analyse würde es ermöglichen, einen weiteren Teil der genetischen Varianz zu erklären und somit die genetischen Einflußgrößen des Lipidstoffwechsels besser zu beschreiben. Diese zusätzlichen Analysen unter Einbeziehung weiterer Gene sind zur Zeit in Arbeit.

Theoretische Modellierung des Lipidstoffwechsels

Die in der klinischen Praxis gemessenen wichtigen Lipidparameter sind in erster Linie LDL-C, HDL-C und Triglyzeride. Die Konzentrationen dieser Lipidfraktionen sind das Resultat der kombinierten Aktivität eines dynamischen Netzwerkes einer Vielzahl von Genen, die für Transferproteine, Rezeptoren, Enzyme, etc. kodieren (Assmann et al., 1995; Beisiegel et al., 1995; Breslow et al., 1995; Bruce et al., 1998; Havel et al., 1995; Hill et al., 1997; Mahley et al., 1999; Willnow 1999). Wie aus den bisher vorgestellten Daten hervorgegangen ist, werden diese Lipidfraktionen zu einem deutlichen Anteil durch genetische Faktoren beeinflusst (Higgins, 2000; Marenberg et al., 1994; Knoblauch et al., 1997). Allerdings ist die Anzahl der genetischen (viele SNPs/Haplotypen in mehreren Genen), aber auch der nicht-genetischen Faktoren sehr groß und viele Parameter sind noch unbekannt bzw. nicht genau quantifiziert. Aus diesem Grund erfordert ein Verständnis der komplexen Zusammenhänge im Lipidstoffwechsel neben den experimentellen Ansätzen auch theoretische Ansätze (Cornish-Bowden, 1999; Heinrich und Schuster, 1996; Reich und Selkov, 1981). Über die wechselseitige Angleichung von experimentellen Daten und theoretischem Modell kann eine Annäherung an die tatsächliche Situation des Stoffwechsels geschehen. Auf der Basis dieser Annahme wurde ein Modell des Lipidstoffwechsels etabliert, das auf mathematischen Gleichungen beruht und eine semi-quantitative Abbildung der wechselseitigen Abhängigkeiten der Metaboliten des Systems erlaubt.

Für die durchgeführte Arbeit wurden sechs Gene, die eine zentrale Rolle im Lipidstoffwechsel spielen, ausgewählt: LPL, CETP, LCAT, HL, LDLR und LRP. Für alle Gene wurden bereits Genotyp-Phänotyp-Assoziationsstudien durchgeführt. Allerdings wurden die meisten dieser Analysen zwischen einem Gen und einem Phänotyp durchgeführt, ohne dass eine kombinierte Betrachtung erfolgte (Gudnason et al., 1998; Kuivenhoven et al., 1998; Nickerson et al., 1998) und die Ergebnisse sind teilweise widersprüchlich.

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Modellierung des Lipidstoffwechsels anhand mathematischer Gleichungen sollte eine Annäherung an folgende Ziele stattfinden: 1. die experimentellen Daten besser zu verstehen und 2. das Modell den experimentellen Daten anzupassen. Ziel dieses iterativen Prozesses ist ein vertieftes Verständnis des Lipidstoffwechsels, eine Prädiktion dessen, was innerhalb des Systems geschieht, wenn Parameter geändert werden sowie eine Quantifizierung dieser Veränderungen.

Das langfristige Ziel einer kompletten Beschreibung der genetischen Faktoren, die die Variabilität des Lipidstoffwechsels determinieren, dient mehreren Zwecken:

4. An einem System wie dem Lipidstoffwechsel können Strategien zur Analyse komplexer Phänotypen validiert werden, da dieses System bereits biochemisch und pathophysiologisch sehr gut charakterisiert ist und somit eine wechselseitige Annäherung von genetischen und anderweitig erhobenen Daten möglich ist. Diese Situation unterscheidet den Lipidstoffwechsel von anderen komplexen Phänotypen, wie z.B. der Hypertonie.
5. Das Verständnis eines wesentlichen quantitativen Risikofaktors für die Entstehung der Arteriosklerose kann einen Beitrag zum Verständnis klinisch definierter qualitativer Endpunkte, wie z.B. Herzinfarkt, ermöglichen.
6. Diese Untersuchungen liefern langfristig die Basis für eine Identifizierung der Faktoren, die mit einer Wahrscheinlichkeit für hohe Lipidwerte (Risikokonstellation für die Entstehung der Arteriosklerose) bzw. für niedrige Lipidwerte (protektive Konstellation für die Entstehung der Arteriosklerose) einhergehen. Die Ergebnisse der vorgestellten Untersuchungen werden in den weiteren Analysen auf ihren prädiktiven Wert hin getestet, um langfristig Menschen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Arteriosklerose zu identifizieren und sie frühzeitig einer entsprechenden Therapie zuzuführen.

Zur Zeit wird das bestehende Modell um weitere Komponenten, z.B. die Apolipoproteine und weitere Kompartimente des Lipidstoffwechsels, z.B. den intrazellulären Lipidstoffwechsel, erweitert.

4 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ABEL L, MÜLLER-MYHSOK B (1998) Robustness and power of the maximum likelihood binomial (MLB) and the maximum likelihood score (MLS) methods in multipoint linkage analysis of affected sibship data. *Am J Hum Genet*, **63**: 638-647.
- 2 ABECASIS GR (2001) Extent and distribution of linkage disequilibrium in three genomic regions. *Am J Hum Genet*, **68**, 191-197.
- 3 ALCAIS A, ABEL L (1999) A quantitative locus extension to the MLB method. *Genet Epidemiol*, **17**: 102-117.
- 4 ALMASY L, WILLIAMS JT, DYER TD, BLANGERO J (1999) Quantitative trait locus detection using combined linkage/disequilibrium analysis. *Genet Epidemiol*, **17**, 31-36.
- 5 ASSMANN G, SCHULTE H (1992) Relation of high density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease: the PROCAM experience. *Am J Cardiol*, **70**: 733-737.
- 6 ASSMANN G, ECKARDSTEIN A, FUNKE H (1995) Störungen im Stoffwechsel der High-density-Lipoproteine. In : Schwandt and Richter (Ref. 78), pp. 227-250.
- 7 AUSTIN MA, SANDHOLZER C, SELBY JV, NEWMAN B, KRAUSS RM, UTERMANN G. (1992) Lipoprotein(a) in women twins: heritability and relationship to apolipoprotein(a) phenotypes. *Am J Hum Genet*, **51**: 829-40.
- 8 AUSTIN MA, TALMUD PJ, LUONG LA, HADDAD L, DAY IN, NEWMAN B, EDWARDS KL, KRAUSS RM, HUMPHRIES SE (1998) Candidate-gene studies of the atherogenic lipoprotein phenotype: a sib-pair linkage analysis of DZ women twins. *Am J Hum Genet*, **62**: 406-19.
- 9 BEAUMONT V, JACOTOT B, BEAUMONT J-L (1976) Ischaemic disease in men and women with familial hypercholesterolemia and xanthomatosis. A comparative study of genetic and environmental factors in 274 heterozygous cases. *Atherosclerosis*, **24**: 441.

- 10 BEISIEGEL U & PATSCH JR (1995) Chylomikronämie. In : Schwandt and Richter (Ref. 78) , pp. 201-226.
- 11 BEISIEGEL U (1998) Lipoprotein metabolism. Eur Heart J Suppl **A**: A20-3.
- 12 BEISIEGEL U, SPECTOR AA (2002) Bone: a forgotten organ in lipidology? Curr Opin Lipidol, **13**: 239-40.
- 13 BRESLOW JL (1995) Familial Disorders of High-Density Lipoprotein Metabolism. In: Scriver et al. (Ref. 80), pp 2031-2052.
- 14 BROWN MS UND GOLDSTEIN JL (1986) A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science, **232**: 34-47.
- 15 BRUCE C, CHOIUINARD RA, TALL AR (1998) Plasma Lipid Transfer Proteins, High-Density Lipoproteins, and Reverse Cholesterol Transport. Annu Rev Nutr, **18**. 297-330.
- 16 CHAWLA A, REPA JJ, EVANS RM, MANGELSDORF DJ (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. Science, **294**: 1866-70.
- 17 COLLINS, FS, GUYER, MS, CHARKRAVARTI, A (1997) Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. Science, **278**, 1580-1.
- 18 CORNISH-BOWDEN A (1999) Metabolic control analysis in biotechnology and medicine. Nat Biotechnol, **17**: 641-643.
- 19 COTTINGHAM RW JR., IDURY RM, SCHAFFER AA (1993) Faster sequential genetic linkage computations. Am J Hum Genet, **53**: 252-263.
- 20 DARVASI A, PISANTE-SHALOM A. (2002) Complexities in the genetic dissection of quantitative trait loci. Trends Genet, **18**: 489.
- 21 DAVIS CG, LEHRMAN MA, RUSSELL DW, ANDERSON RG, BROWN MS, GOLDSTEIN JL (1986) The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. Cell, **45**: 15-24.
- 22 DAWSON E, ABECASIS GR, BUMPSTEAD S, CHEN Y, HUNT S, BEARE DM, PABIAL J, DIBLING T, TINSLEY E, KIRBY S, CARTER D, PAPASPYRIDONOS M, LIVINGSTONE S, GANSKE R, LOHMUSSEAR E,

- ZERNANT J, TONISSON N, REMM M, MAGI R, PUURAND T, VILO J, KURG A, RICE K, DELOUKAS P, MOTT R, METSPALU A, BENTLEY DR, CARDON LR, DUNHAM I (2002) A first-generation linkage disequilibrium map of human chromosome 22. *Nature*, **418**: 544-8.
- 23 DIPPLEKM UND MCCABE ER (2000) Phenotypes of patients with simple mendelian traits are complex traits: Thresholds, modifiers, and system dynamics. *Am J Hum Genet*, **66**: 1729-1735.
- 24 DUNNING AM, DUROCHER F, HEALEY CS, TEARE MD, MCBRIDE SE, CARLOMAGNO F, XU ABECASIS GR, CARDON LR, COOKSON WO (2000) A general test of association for quantitative traits in nuclear families. *Am J Hum Genet*, **66**, 279-92.
- 25 EURLINGS PM, VAN DER KALLEN CJ, GEURTS JM, VAN GREEVENBROEK MM, DE BRUIN TW (2001) Genetic dissection of familial combined hyperlipidemia. *Mol Genet Metab*, **74**: 98-104.
- 26 FITZKY BU, GLOSSMANN H, UTERMANN G, MOEBIUS FF. (1999) . Molecular genetics of the Smith-Lemli-Opitz syndrome and postsqualene sterol metabolism. *Curr Opin Lipidol*, **10**: 123-31.
- 27 FRIEDEWALD WT, LEVY RI, FREDRICKSON DS (1972) Friedewald formula: Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without the use of preparative ultracentrifugation. *Clin Chem*, **18**: 499-502.
- 28 FULKER, D.W., CHERNY, S.S., SHAM, P.C., AND HEWITT, J.K. (1999) Combined linkage and association analysis for quantitative traits. *Am J Hum Genet*, **64**, 259-267.
- 29 GARCIA CK, WILUND K, ARCA M, ZULIANI G, FELLIN R, MAIOLI M, CALANDRA S, BERTOLINI S, COSSU F, GRISHIN N, BARNES R, COHEN JC, HOBBS HH (2001) Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*, **292**: 1394-8.

- 30 GOLDSTEIN JL, SCHROTT HG, HAZZARD WR, BIERMAN EL, MOTULSKY AG (1973) Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest*, **52**: 1544-1568.
- 31 GREWAL T, BOUDREAU M, ROY M, CHAMBERLAND A, LEFEBVRE C, LAVIGNE J, DAVIGNON J, AND MINNICH A (1998) Expression of gamma-IFN responsible genes in scavenger receptor over-expressing monocytes is associated with xanthomatosis. *Atherosclerosis*, **138**: 335-45.
- 32 GUDNASON V, ZHOU T, THORMAR K, BAEHRING S, COOPER J, MILLER G, HUMPHRIES SE, SCHUSTER H (1998) Low density lipoprotein receptor gene PvuII intron 15 polymorphism using the polymerase chain reaction: association with plasma lipid traits in healthy men and women. *Dis Markers*, **13**: 209-20.
- 33 HAGBERG, J.M., WILUND, K.R., AND FERRELL, R.E. (2000) APO E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. *Physiol Genomics*, **4**, 101-108.
- 34 HAVEL RJ, KANE JP (1995) : Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins. In: Scriver et al. (Ref. 80) vol II, pp. 1841-1851.
- 35 HEEREN J, BEISIEGEL U (2001) Intracellular metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*, **12**: 255-60.
- 36 HEGELE RA. (2002) Environmental modulation of atherosclerosis end points in familial hypercholesterolemia. *Atheroscler Suppl* , **2**: 5-7.
- 37 HEINRICH R, SCHUSTER S (1996) Regulation of cellular systems. Chapman and Hall, New York.
- 38 HIGGINS M. (2000) Epidemiology and prevention of coronary heart disease in families. *Am J Med*, **108**, 387-95.
- 39 HILL SA UND MCQUEEN MJ (1997) Reverse Cholesterol Transport - A Review of the Process and its Clinical Implications. *Clinical Biochemistry* **30**, 517-525.

- 40 HOBBS HH, LEITERSDORF E, LEFFERT CC, CRYER DR, BROWN MS, GOLDSTEIN JL (1989) Evidence for a dominant gene that suppresses hypercholesterolemia in a family with defective low density lipoprotein receptors. *J Clin Invest*, **84**: 656-664.
- 41 HOBBS HH, BROWN MS, GOLDSTEIN JL (1992) Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutation*, **1**: 445-466.
- 42 HOLLAND PM, ABRAMSON RD, WATSON R, GELFAND DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction products by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermophilus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci*, **88**: 7276-7280.
- 43 JAROSS, W., ASSMANN, G., BERGMANN, S. AND SCHULTE H. (1994) Comparison of risk factors for coronary heart disease in Dresden and Munster. Results of the DRECAN (Dresden Cardiovascular Risk and Nutrition) study and the PROCAM (Prospective Cardiovascular Munster) Study. *Eur J Epidemiol*, **10**: 307-15.
- 44 KANNEL, WB, CASTELLI, WP, GORDON, T, MCNAMARA, PM (1971) Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Ann Intern Med*, **74**: 1-12.
- 45 KHACHADURIAN AK (1964) The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med*, **37**: 402-410.
- 46 KNOBLAUCH H, BUSJAHN A, MÜNTER S, NAGY S, FAULHABER H, ROHDE K, SCHUSTER H, LUFT FC (1997) Heritability analysis of lipids and three gene loci in twins link the macrophage scavenger receptor to HDL cholesterol concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**: 2054-2060.
- 47 KNOBLAUCH H, BUSJAHN A, MULLER-MYHSOK B, FAULHABER HD, SCHUSTER H, UHLMANN R, LUFT FC (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene locus is related to body mass index and lipid values in healthy nonobese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**: 2940-4.

- 48 KNOBLAUCH H, MULLER-MYHSOK B, BUSJAHN A, BEN AVI L, BAHRING S, BARON H, HEATH SC, UHLMANN R, FAULHABER HD, SHPITZEN S, AYDIN A, RESHEF A, ROSENTHAL M, ELIAV O, MUHL A, LOWE A, SCHURR D, HARATS D, JESCHKE E, FRIEDLANDER Y, SCHUSTER H, LUFT FC, LEITERSDORF E (2000) A cholesterol-lowering gene maps to chromosome 13q. *Am J Hum Genet*, **66**: 157-66.
- 49 KNOBLAUCH H, SCHUSTER H, LUFT FC, REICH J (2000) A pathway model of lipid metabolism to predict the effect of genetic variability on lipid levels. *J Mol Med*, **78**: 507-15.
- 50 KNOBLAUCH H, BAUERFEIND A, KRÄHENBÜHL C, DAURY A, ROHDE K, BEJANIN S, ESSIUX L, SCHUSTER H, LUFT FC, AND REICH J (2002) Common haplotypes in five genes explain forty percent of the genetic variance on LDL and HDL cholesterol in the general population. *Hum Mol Genet*, **11**: 1477-1485.
- 51 KRUGLYAK L, LANDER ES (1995) Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet*, **57**: 439-454.
- 52 KRUGLYAK L, DALY MJ, REEVE-DALY MP, LANDER ES (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet*, **58**: 1347-1363.
- 53 KUIVENHOVEN JA, JUKEMA JW, ZWINDERMAN AH, DE KNIJFF P, MCPHERSON R, BRUSCHKE AV, LIE KI, KASTELEIN JJ (1998) The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. *N Engl J Med*, **338**: 86-93.
- 54 LUFT FC, SCHUSTER H, BILGINTURAN, WIENKER T (1995) . Treasure your exceptions: What can we learn from autosomal dominant inherited forms of hypertension. *J Hypertens*, **13**: 1535-8.
- 55 MAHLEY RW & JI ZS (1999) Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res*, **40**: 1-16.

- 56 MARENBERG ME, RISCH N, BERKMAN LF, FLODERUS B, DE FAIRE U (1994) Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med*, **330**: 1041-6.
- 57 MARTIN N, BOOMSMA D, MACHIN G. (1997) A twin-pronged attack on complex traits. *Nat Genet*, **17**: 387-92.
- 58 MCCOMBIE WR, HEINER C, KELLEY JM, FITZGERALD MG, GOCAYNE JD (1992) Rapid and reliable fluorescent cycle sequencing of double-stranded templates. *DNA Seq*, **2**: 289-296.
- 59 MCPHERSON ET AL. (2001) A physical map of the human genome. *Nature*, **409**: 934-41.
- 60 MURRAY, CJL, AND LOPEZ, AD (1997) Mortality by cause for eight regions of the world: Global burden of disease study. *Lancet*, **349**: 1269-1276.
- 61 NADEAU J (2001) Modifier genes in mice and humans. *Nature Genet*, **2**: **165-174**.
- 62 NICKERSON DA, TAYLOR SL, WEISS KM, CLARK AG, HUTCHINSON RG, STENGARD J, SALOMAA V, VARTIAINEN E, BOERWINKLE E, SING CF (1998) DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nat Genet* **19**: 233-240.
- 63 OBER C, ABNEY M, MCPEEK MS. (2001) The genetic dissection of complex traits in a founder population. *Am J Hum Genet*, **69**: 1068-79.
- 64 OTT J (1991) Analysis of human genetic linkage, 2d ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- 65 PAJUKANTA P, TERWILLIGER JD, PEROLA M, HIEKKALINNA T, NUOTIO I, ELLONEN P, PARKKONEN M, HARTIALA J, YLITALO K, PIHLAJAMAKI J, PORKKA K, LAAKSO M, VIKARI J, EHNHOLM C, TASKINEN MR, PELTONEN L (1999) Genomewide scan for familial combined hyperlipidemia genes in finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol, and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet*, **64**: 1453-63.

- 66 PATERSON AH (1995) Molecular dissection of quantitative traits: progress and prospects. *Genome Res.* **5**: 321-33.
- 67 PRITCHARD JK, PRZEWORSKI M (2001) Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet*, **69**: 1-14.
- 68 REICH JG, SELKOV EE (1981) *Energy metabolism of the cell*. Academic Press, New York.
- 69 REICH DE, CARGILL M, BOLK S, IRELAND J, SABETI PC, RICHTER DJ, LAVERY T, KOUYOUMJIAN R, FARHADIAN SF, WARD R, LANDER ES (2001) Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*, **411**: 199-204.
- 70 RIDKER PM, STAMPFER MJ, RIFAI N. (2001) Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA*, **285**: 2481-5.
- 71 ROHDE K, AND FUERST R (2001) Haplotyping and estimation of haplotype frequencies for closely linked biallelic multilocus genetic phenotypes including nuclear family information. *Hum Mutat*, **17**: 289-95.
- 72 ROSENTHAL A, CHARNOCK-JONES DS (1992) New protocols for DNA sequencing with dye terminators. *DNA Seq*, **3**: 61-64.
- 73 ROSS R (1999) Mechanism of Disease: Atherosclerosis- An inflammatory disease. *N Eng J Med*, **340**: 115-126.
- 74 SACHIDANANDAM ET AL. (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, **409**: 928-33.
- 75 SCHOLZ M, KRAFT HG, LINGENHEL A, DELPORT R, VORSTER EH, BICKEBOLLER H, UTERMANN (1999) Genetic control of lipoprotein(a) concentrations is different in Africans and Caucasians. *Eur J Hum Genet*, **7**: 169-78.

- 76 SCHIELE F, DE BACQUER D, VINCENT-VIRY M, BEISIEGEL U, EHNHOLM C, EVANS A, KAFATOS A, MARTINS MC, SANS S, SASS C, VISVIKIS S, DE BACKER G, SIEST G. (2000) Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis*, **152**: 475-88.
- 77 SCHUSTER H, LAMPRECHT, A JUNGHANS C, DIETZ B, BARON H, NOTHNAGEL M, MÜLLER-MYHSOK B, LUFT, FC (1998) Approaches to the genetics of cardiovascular disease through genetic field work. *Kidney Int*, **5**: 1449-54.
- 78 SCHWANDT P & RICHTER WO (1995) : Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Schattauer, Stuttgart.
- 79 SCRIVER CR UND WATERS PJ (1999) Monogenic traits are not simple: lessons from Phenylketonuria. *Trends Genet*, **15**: 267-272.
- 80 SCRIVER SR, BEAUDET AC, SLY WS & VALLE D (1995) Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol II. McGraw Hill, New York.
- 81 SHAM PC, CHERNY SS, PURCELL S, HEWITT JK (2000) Power of linkage versus association analysis of quantitative traits, by use of variance components models, for sibship data. *Am J Hum Genet*, **66**: 1616-1630.
- 82 SLIMANE MN, POUSSE H, MAATOUG F, HAMMAMI M, BEN-FARHAT MH (1993) Phenotypic expression of familial hypercholesterolemia in central and southern Tunisia. *Atherosclerosis*, **104**: 153-158.
- 83 SUN XM, PATEL DD, WEBB JC, KNIGHT BL, FAN LM, CAI HJ, SOUTAR AK (1994) Familial hypercholesterolemia in China. Identification of mutations in the LDL-receptor gene that result in a receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb* **14**: 85-94.
- 84 TAILLON-MILLER P, BAUER-SARDINA I, SACCONI NL, PUTZEL J, LAITINEN T, CAO A, KERE J, PILIA G, RICE JP, KWOK PY (2000) Juxtaposed regions of extensive and minimal linkage disequilibrium in human Xq25 and Xq28. *Nat Genet*, **25**: 324-328.

- 85 THE INTERNATIONAL SNP MAP WORKING GROUP. (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, **409**: 928-933.
- 86 UMANS-ECKENHAUSEN MA, DEFESCHE JC, SIJBRANDS EJ, SCHEERDER RL, KASTELEIN JJ (2001) Review of first 5 years of screening for familial hypercholesterolaemia in the Netherlands. *Lancet*, **357**: 165-8.
- 87 UTERMANN G (1988) Apolipoprotein polymorphism and multifactorial hyperlipidaemia. *J Inherit Metab Dis*, **11 Suppl 1**: 74-86.
- 88 UTERMANN G. (1999) Genetic architecture and evolution of the lipoprotein(a) trait. *Curr Opin Lipidol*, **10**: 133-41.
- 89 VAN OMMEN (2002) The Human Genome Project and the future of diagnostics, treatment and prevention. *J Inherit Metab Dis*, **25**: 183-8.
- 90 VENTER ET AL. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**: 1304-51.
- 91 VERGOPOULOS A, BAJARI T, JOUMA M, KNOBLAUCH H, AYDIN A, BAHRING S, MUELLER-MYHSOK B, DRESEL A, JOUBRAN R, LUFT FC, SCHUSTER H. (1997) A xanthomatosis-susceptibility gene may exist in a Syrian family with familial hypercholesterolemia. *Eur J Hum Genet*, **5**: 315-23.
- 92 WEISS KM, CLARK AG (2002) Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *Trends Genet*, **18**: 19-24.
- 93 WELCH CL, XIA YR, SHECHTER I, FARESE R, MEHRABIAN M, MEHDIZADEH S, WARDEN CH, LUSIS AJ (1996) Genetic regulation of cholesterol homeostasis: chromosomal organization of candidate genes. *J. Lipid Res*, **37**: 1406-1421.
- 94 WILLNOW TE (1999) Low-density lipoprotein receptor gene family: Multiple roles in lipid metabolism. *J. Mol Med*, **77**: 306-315.
- 95 YI N, XU S (2002) Mapping quantitative trait loci with epistatic effects. *Genet Res* **79**: 185-98.

5 DANKSAGUNG

Ohne die Hilfe und Unterstützung vieler Menschen wären diese Arbeiten nicht möglich gewesen. Insbesondere möchte ich folgenden Personen danken:

Meinen Eltern, die mir den Weg bereitet haben und die Grundlagen dafür gelegt haben, daß ich das tun konnte, was hier vorgestellt wurde.

Meiner Frau Sylvi, die mir immer mit Rat, Tat und Unterstützung an der Seite gestanden hat

Meinem Freund und Kollegen Athanasios Vergopoulos, der mich seit dem Anfang dieser Arbeiten begleitet hat und mit mir durch viele Aufs und Abs gegangen ist.

Meinen Kollegen aus dem Labor an der Franz-Volhard-Klinik, Atakan Aydin, Sylvia Bähring, Regina Uhlmann und Yvette Neuenfeld, die mir so viel geholfen und erklärt haben

Meinem Mentor, Professor Friedrich C. Luft, der die Begeisterung für die klinische Arbeit in mir geweckt hat und dazu beigetragen hat, daß dies bis heute so geblieben ist.

Meinem Mentor Professor Jens Reich, durch den ich in mathematisch-statistische Tiefen vorgestoßen bin, von denen ich nie zu träumen gewagt hätte und der mir gezeigt hat, was intensive Beschäftigung mit einem Thema bedeutet.

Meiner Kollegin Anja Bauerfeind, ohne die die ganzen statistischen Berechnungen niemals durchgeführt worden wären.

Meinem Mentor Herbert Schuster, der mich seit 1993 begleitet, gefördert und mir immer die Freiheit gelassen hat, die ich brauchte.

Herrn Professor Karl Sperling, der diese Arbeit unterstützt und gefördert hat und immer mit gutem Rat zur Seite stand.

Meinen Kollegen am Institut für Medizinische Genetik der Charité, Sigrid Tinschert, Erika Benderoth und Anke Wittwer, mit denen es immer Spaß gemacht hat, zusammen zu arbeiten.